

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

DANIELA BECK DA SILVA MARCONDES

**INDUÇÃO DE APOPTOSE PELO EXTRATO E FRAÇÕES DE
Lafoensia pacari A. St.-Hil, LYTHRACEAE, EM CÉLULAS TUMORAIS**



**CURITIBA
2013**

DANIELA BECK DA SILVA MARCONDES

**INDUÇÃO DE APOPTOSE PELO EXTRATO E FRAÇÕES DE
Lafoensia pacari A. St.-Hil, LYTHRACEAE, EM CÉLULAS TUMORAIS**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a. Almeriane M. Weffort Santos

**CURITIBA
2013**

Marcondes, Daniela Beck da Silva

Indução de apoptose pelo extrato e frações de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil, Lythraceae, em células tumorais / Daniela Beck da Silva Marcondes – Curitiba, 2013.

96 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientador: Professor Dr. Cid Aimbiré de Moraes Santos

Coorientadora: Professora Dra. Almeriane Maria Weffort Santos

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2013.

Inclui bibliografia

1. *Lafoensia pacari*. 2. Linhagens tumorais. 3. Citotoxicidade. 4. Proliferação celular. 5. Apoptose. I. Santos, Cid Aimbiré de Moraes. II. Santos, Almeriane Maria Weffort. III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.321

TERMO DE APROVAÇÃO

DANIELA BECK DA SILVA MARCONDES

Título: INDUÇÃO DE APOPTOSE PELO EXTRATO E FRAÇÕES DE LAFOENSIA PACARI A. ST.-HIL, LYTHRACEAE, EM CÉLULAS TUMORAIS

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Mestre, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, Medicamentos e Correlatos.


Profª. Drª. Almeriane Maria Weffort-Santos
Co-orientadora


Profª. Drª. Laila Salmen Espindola
Universidade de Brasília


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zampronio
Universidade Federal do Paraná

Curitiba, 25 de fevereiro de 2013.

NOTA BIOGRÁFICA

A autora graduou-se em Farmácia pela Universidade Federal do Paraná em 2010. Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica PIBIC/CNPq entre agosto de 2006 e julho de 2007, no laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da mesma instituição, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Lia Rieck, desenvolvendo o trabalho “Estudo das ações envolvidas no efeito do extrato seco de *Piper methysticum* G. Forst, Piperaceae, em musculatura lisa vascular e não vascular”, cujos resultados foram apresentados no XV Evento de Iniciação Científica da UFPR, 2007. Seu trabalho de conclusão de curso “Análise fitoquímica das cascas do caule de *Lafoensia pacari* A.St.-Hil. e a influência de seu extrato hidroalcoólico sobre o comportamento de células Daudi”, sob orientação da Prof.^a Dr.^a Almeriane M. Weffort Santos, foi o incentivo para a continuação da pesquisa no mestrado. Durante o primeiro semestre de 2010, realizou estágio na empresa Herbarium – Laboratório Botânico Ltda. e, entre o segundo semestre de 2010 e início de 2011, ocupou o cargo de farmacêutica responsável técnica na farmácia de manipulação e homeopatia Bula Verdde. Em março de 2011, ingressou no Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, como bolsista REUNI, onde desenvolveu o projeto baseado no estudo das ações do extrato e frações de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, em linhagens tumorais, o qual foi contemplado pelo Edital MCT/CNPq nº 14/2011 – Universal. Resultados parciais contidos nesta dissertação de mestrado foram apresentados no VIII Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, I Simpósio Internacional de Farmacognosia e no XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil.

DEDICATÓRIA

Ao meu vô Juca, que sempre acreditou no Dedal.
À minha mãe Susana, que há onze anos se beneficia dos seus efeitos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Universidade Federal do Paraná, por me proporcionar os meios para buscar o conhecimento.

Aos meus queridos orientadores Prof. Tit. Cid Aimbiré de Moraes Santos e Prof.^a Dr.^a Almeriane Maria Weffort Santos, pela seriedade com que conduzem seus projetos, pela dedicação constante, paciência, atenção e motivação, mostrando-se exemplos de pesquisadores, compartilhando seus conhecimentos e despertando em mim o amor pela pesquisa e, acima de tudo, por terem me acolhido em seus laboratórios e acreditado no meu trabalho.

Aos meus pais, Pedro e Susana, pelo amor incondicional, compreensão e incentivo durante minha vida e trajetória acadêmica, e às minhas irmãs, Juliana e Alice, pelo carinho e momentos de descontração.

Ao meu noivo, Saulo, por todo amor, companheirismo e por sempre me mostrar todas as possibilidades. BAPTE!

Ao meu avô, Cel. José Alves Marcondes (*in memoriam*), por ter despertado o interesse em estudar a fundo os efeitos do Dedal, e à Fazenda da Mata, pelo fornecimento de amostras da planta para a pesquisa.

As amigas do laboratório de Farmacognosia, Cláudia, Kely e Luma, e do laboratório de Hematologia, Monique e Thaís, pela ajuda valiosa durante este período de trabalho e pela amizade, que permanece.

A Prof.^a Dr.^a Fabiane Gomes de Moraes Rego, do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UFPR, pelo precioso auxílio na utilização do equipamento Cobas Mira do laboratório de Bioquímica.

Ao aluno de doutorado, Lucas Ferrari de Andrade, do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da UFPR, pela ajuda com o citômetro de fluxo.

A D. Maria e Irene, pela atenção e valiosíssima colaboração.

A técnica Maria da Graça Toledo, por ter me auxiliado nos experimentos que contaram com os equipamentos da Central Analítica.

Ao REUNI, Programa de Apoio a Planos de Reestruturação e Expansão das Universidades Federais, pela bolsa de mestrado.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelo apoio financeiro através do Edital Universal MCT/CNPq nº 14/2011.

EPÍGRAFE

O conhecimento é o ato de entender a vida.
Aristóteles (384-322 a.C.)

LISTA DE FIGURAS, FLUXOGRAMAS E TABELAS

Figura 1. Incidência de câncer no Brasil	10
Figura 2. <i>Lafoensia pacari</i> : detalhes da planta	17
Figura 3. Local de coleta das cascas do caule de <i>Lafoensia pacari</i>	23
Figura 4. Rendimento de extratos de <i>Lafoensia pacari</i> obtidos com diferentes solventes polares	34
Figura 5. CCD do ExtMeOH e das frações F1, F2, F3, F4 de <i>Lafoensia pacari</i>	36
Figura 6. Efeitos do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> sobre linhagens leucêmicas	39
Figura 7. Efeito do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> e frações sobre a linhagem U-937 pelo método de LDH	41
Figura 8. Influência do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> sobre a morfologia de células de linhagens leucêmicas	43
Figura 9. Efeito do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> sobre o potencial clonogênico de linhagens leucêmicas	45
Figura 10. Efeitos do ácido elágico e do extrato e frações de <i>Lafoensia pacari</i> sobre a linhagem U-937	46
Figura 11. Efeito do tempo de exposição do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> sobre a linhagem U-937 detectado por citometria de fluxo	51
Figura 12. Efeito do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> sobre o ciclo celular de células U-937	53
Figura 13. Efeitos da concentração do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> sobre a linhagem HeLa	55
Figura 14. Efeitos da concentração do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> sobre a linhagem HRT-18	57
Figura 15. Efeitos da concentração do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> sobre a linhagem SY5Y	58
Figura 16. Efeito do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> sobre células mononucleares da medula óssea de camundongos	60
Figura 17. Efeitos da concentração do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> sobre células MNC humanas obtidas de sangue periférico	61
Figura 18. Efeito <i>in vitro</i> de fitohemaglutinina sobre células MNC humanas	63
Figura 19. Efeitos da concentração do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> sobre células MNC humanas estimuladas por fitohemaglutinina	64
Figura 20. Efeitos do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> sobre diferentes linhagens tumoriais e células MNC de sangue periférico humano	66
Fluxograma 1. Resumo das etapas que culminam no desenvolvimento de um câncer	03
Fluxograma 2. Fluxograma do preparo do ExtMeOH e das frações de <i>Lafoensia pacari</i>	24
Tabela 1. Frações do extrato metanólico de <i>Lafoensia pacari</i> e seus rendimentos	35
Tabela 2. Efeito do ácido elágico e do extrato de <i>Lafoensia pacari</i> e suas frações sobre a viabilidade celular da linhagem U-937	47

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AE	Ácido elágico
ANOVA	Análise de variância
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BuOH	Butanol
CCD	Cromatografia em camada delgada
CLS	<i>Cell lines Service</i>
DCM	Diclorometano
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DP	Desvio padrão
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Etanol
ExtMeOH	Extrato metanólico bruto
FITC	isotiocianato de fluoresceína
FSC	<i>Forward Side Scatter</i>
F1	Fração hidrofóbica
F2	Fração acetato de etila
F3	Fração butanólica
F4	Fração aquosa
HeLa	Henrietta Lacks
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanossulfônico
HPV	<i>Human Papiloma Virus</i>
IP	Iodeto de propídio
Laser	<i>Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation</i>
LDH	Lactato Desidrogenase
MeOH	Metanol
MGG	May-Grunwald-Giemsa
MNC	Células mononucleares
MS	Mato Grosso do Sul
PBS	Salina tamponada com fosfato (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)
PHA	Fitohemaglutinina (<i>Phytohemagglutinin</i>)
PMSF	Fluoreto de fenil metil sulfonil
RNA	Ácido ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SSC	<i>Side Light Scatter</i>
TA	Temperatura ambiente
Tris	Tris hidroximetil aminometano
UEPG	Universidade Estadual de Ponta Grossa
UFF	Universidade Federal Fluminense
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UV	Ultravioleta
7-AAD	7-amino-actinomicina D

RESUMO

Este trabalho propôs-se a avaliar a influência do extrato metanólico das cascas do caule de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, conhecida popularmente como dedal e com a indicação de seu uso para tratamento de câncer, primeiramente, sobre o comportamento das linhagens celulares leucêmicas humanas, U-937, Daudi e Jurkat, em sistemas de cultura *in vitro*. Os ensaios realizados com essas linhagens demonstraram claramente que o extrato e as frações preparados dessa planta exercem efeitos citostático e citotóxico significativos para as linhagens U-937, Daudi e Jurkat, os quais são independentes da presença do ácido elágico, marcador fitoquímico da espécie. Na avaliação do efeito tóxico pelo método de quantificação da lactato desidrogenase (LDH), o extrato e as frações hidrofóbica (F1) e ActOEt (F2) apresentaram toxicidade significativa a 100 µg/mL, enquanto que as frações *n*-BuOH (F3) e aquosa (F4) em 1000 µg/mL. O extrato de *L. pacari* foi capaz de inibir a formação de colônias de progenitores leucêmicos de células U-937 em meio semissólido. Citocentrifugados das mesmas linhagens tratadas com 1000 µg/mL de extrato mostraram características típicas de apoptose, com a presença de vacúolos citoplasmáticos, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e formação de corpos apoptóticos. A exposição de células U-937, assim como outras representativas de câncer de colo do útero (HeLa), de cólon (HRT-18) e de neuroblastoma (SY5Y), além de células mononucleares (MNC) ao extrato de *L. pacari* levou à alterações características de apoptose no ciclo celular, bem como co-expressão da Anexina V e do 7-AAD. Interessante ressaltar que, em contraste com os resultados descritos para as linhagens tumorais, o extrato de *L. pacari* pouco interferiu na viabilidade ou influenciou na proliferação de células MNC de medula óssea de camundongos, como também apresentou maior indução de apoptose em células MNC isoladas do sangue periférico de voluntários sadios quando estimuladas com fitohemaglutinina, o que sugere que o efeito indutor de apoptose parece repousar sobre células que estão em atividade metabólica intensa e/ou que estejam em ciclo celular. Embora mais estudos sejam necessários, o conjunto de resultados apresentados revelou alguns aspectos interessantes e ainda não relatados com relação às atividades biológicas dessa espécie brasileira, sugerindo investigações futuras para assegurar seu uso com fins terapêuticos.

Palavras-chaves:

Lafoensia pacari; linhagens tumorais; citotoxicidade; proliferação celular; apoptose.

ABSTRACT

*The aim of this work was to evaluate the influence of the methanolic extract and its fractions prepared from the stem barks of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, popularly known as "dedal" and used for treating cancer, on the behavior of the human U-937, Daudi, and Jurkat leukemic cell lines, in in vitro culture systems. The assays conducted with these leukemic lineages have clearly shown their cytostatic and cytotoxic effects, which were independent of the presence of ellagic acid, the phytochemical marker of the species. Significant toxicity, determined by the quantification of lactate dehydrogenase (LDH), has been shown for the extract as well as for its hydrophobic (F1) and EtOAc (F2) fractions only at a 100 µg/mL along with the n-BuOH (F3) and the aqueous (F4) fractions at 1000 µg/mL. The extract was also able to inhibit the formation of colonies by U-937 cells in clonogenic assays. Cytospun preparations of cells treated with 1000 µg/mL of extract showed typical characteristics of apoptosis, with the presence of cytoplasmic vacuoli, chromatin condensation, nuclear fragmentation, and formation of apoptotic bodies. Exposition of U-937 cells as well as other cell lines representatives of cervical (HeLa), colon (HRT-18), and neuroblastoma (SY5Y) cancers, along with human mononuclear cells to L. pacari extract led to changes characteristics of apoptosis induction, including morphological aspects, alteration of the cell cycle status, and co-expression levels of Annexin V and 7-AAD. Interesting to note that, in contrast with the results described for the tumor cell lines, the extract has little interfered on the viability or influenced the proliferation of mice bone marrow mononuclear cells. Higher induction of apoptosis in peripheral blood mononuclear cells isolated from healthy volunteers was observed when these cells were stimulated to proliferate with phytohemagglutinin, suggesting that the effect of inducing apoptosis seems to rest on cells that are under intense metabolic activity or cycling. Although further studies are needed, the findings herein described revealed some interesting aspects not yet reported with respect to the biological activities of this species, suggesting future investigations to ensure its use for therapeutic purposes.*

Keywords:

Lafoensia pacari; tumor lineages; cytotoxicity; cell proliferation; apoptosis.

SUMÁRIO

NOTA BIOGRÁFICA.....	iii
DEDICATÓRIA.....	iv
AGRADECIMENTOS.....	v
EPÍGRAFE.....	vi
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	vii
ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Câncer.....	02
1.1.1. Carcinogênese.....	02
1.1.2. Mecanismos de controle da carcinogênese	04
1.1.2.1. Imunológicos.....	04
1.1.2.2. Apoptose.....	05
1.1.3. Tipos de câncer	06
1.1.3.1. Leucemias	07
1.1.3.2. Câncer do colo de útero.....	08
1.1.3.3. Câncer de cólon e reto	08
1.1.3.4. Neuroblastoma	09
1.1.4. Epidemiologia do câncer.....	09
1.2. Câncer e plantas medicinais	10
1.3. Linhagens tumorais	11
1.3.1. U-937	12
1.3.2. Daudi.....	13
1.3.3. Jurkat	13
1.3.4. HeLa.....	13
1.3.5. HRT-18	14
1.3.6. SY5Y.....	14
1.4. Linhagens tumorais e a indução de apoptose por plantas medicinais	14
1.5. <i>Lafoensia pacari</i> A. St.-Hil., LYTHRACEAE.....	16
1.5.1. Aspectos químicos e farmacológicos	18
2. OBJETIVOS	20
2.1. Objetivo geral	20
2.2. Objetivos específicos	20
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Soluções.....	21
3.2. Material botânico	22
3.2.1. Extrato.....	23
3.2.2. Frações.....	24
3.2.3. CCD.....	25
3.3. Ensaio biológico <i>in vitro</i>	25
3.3.1. Manutenção das linhagens tumorais	25
3.3.2. Ensaio com linhagens tumorais.....	25

3.3.3. Isolamento de células mononucleares humanas	26
3.3.3.1. Ativação de linfócitos por PHA.....	26
3.3.4. Isolamento de células da medula óssea de camundongo	26
3.3.5. Viabilidade/Toxicidade celulares	27
3.3.5.1. Determinação da lactato desidrogenase (LDH)	27
3.3.6. Citocentrifugados	28
3.3.6.1. Coloração de May-Grünwald-Giemsa	28
3.3.7. Ensaio clonogênico	28
3.3.8. Citometria de Fluxo.....	28
3.3.8.1. Anexina V <i>versus</i> 7-AAD	28
3.3.8.2. Ciclo celular	29
3.3.8.3. Análise de linfócitos por citometria de fluxo	29
3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS	29
3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS – FORMATAÇÃO	30
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	31
4.1. MATERIAL BOTÂNICO	32
4.1.1. Escolha do solvente extrator	32
4.1.2. Rendimento do extrato e frações.....	34
4.1.3. Perfil cromatográfico	35
4.1.3.1 CCD	35
4.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS <i>in vitro</i>	36
4.2.1. Tratamento das linhagens U-937, Daudi e Jurkat com extrato de <i>L. pacari</i>	37
4.2.1.1. Citotoxicidade com Azul de Trypan	37
4.2.1.2. Citotoxicidade com LDH.....	40
4.2.1.3. Citocentrifugados	42
4.2.1.4. Ensaios clonogênicos.....	44
4.2.2. Tratamento da linhagem U-937 com ácido elágico.....	45
4.2.3. Avaliação de apoptose da linhagem U-937 tratada com extrato de <i>L. pacari</i> por citometria de fluxo.....	48
4.2.3.1. Expressão de Anexina V <i>versus</i> 7-AAD	49
4.2.3.2. Ciclo Celular	52
4.2.4. Avaliação de apoptose das linhagens HeLa, HRT-18, SY5Y tratadas com extrato de <i>L. pacari</i> por citometria de fluxo	54
4.2.5. Células de medula óssea de camundongos tratadas com extrato de <i>L. pacari</i>	59
4.2.5.1. Citotoxicidade por Azul de Trypan.....	59
4.2.6. Células MNC de sangue periférico tratadas com extrato de <i>L. pacari</i>	60
5. CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	

1. INTRODUÇÃO

A vida de uma célula inicia-se quando a divisão que a originou termina e encerra-se quando toda a sua atividade acaba. Ao conjunto de processos que ocorrem entre duas divisões celulares denomina-se ciclo celular, ou ciclo generativo, programa pelo qual as células proliferam, aumentando seu número. Em uma célula eucariótica, este processo é dividido em duas etapas:

1. Intérfase, período em que a célula sintetiza novas proteínas e duplica seu DNA, subdividido em três etapas distintas: fase G_1 , fase S e fase G_2 ;
2. Mitose, período em que ocorre a divisão celular propriamente dita (fase M).

A expressão de vários genes é característica da fase G_1 , a qual culmina na produção de muitas proteínas, principalmente aquelas necessárias à síntese de DNA. Durante a fase S subsequente, a célula está aumentada de tamanho e replica seu DNA, obtendo, no final da etapa, duas fitas completas e idênticas de seu DNA. Na fase G_2 , a célula aumenta ainda mais seu volume e sintetiza as proteínas necessárias e suficientes para duas células. Ao final desta fase, a célula entra na última etapa do ciclo (fase M), no qual sofre o processo de citocinese, culminando no aparecimento de duas unidades idênticas, designadas células filhas. Se essas células iniciarem outro ciclo, entram na fase G_1 e dividem-se, culminando em quatro descendentes, e assim sucessivamente (Bogliolo & Brasileiro Filho, 2006).

Dessa forma, a proliferação celular se dá em ritmo exponencial de unidades. Mas, essas células podem tornar-se quiescentes, entrando em intérfase, ou fase G_0 , caracterizada pela cessação do processo de divisão celular. Através de estímulos externos, é possível a célula retornar ao seu ritmo normal de multiplicação. Há uma série de proteínas que regulam e controlam o ciclo celular, sabendo de forma correta quando e como as células devem ou não se dividir.

Todo este programa, tanto dos processos que levam à divisão quanto daqueles responsáveis pela cessação da divisão, é restritivamente controlado; caso contrário, as células irão dividir-se continuamente. Ou seja, qualquer interferência no processo de proliferação das células, como erros durante a transcrição e síntese do DNA ou a desregulação do ciclo celular, pode levar à produção demasiada e descontrolada de células, definida como uma população de células com características daquelas presentes em qualquer tipo de câncer (Kumar et al., 2008).

1.1. CÂNCER

Câncer é o nome dado ao conjunto de doenças que tem em comum a proliferação desordenada de células. Dividindo-se de forma inadequada, estas células tendem a ser agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores malignos, que podem espalhar-se para outras regiões do organismo, gerando metástases ou tumores secundários (Liu & Robins, 2006).

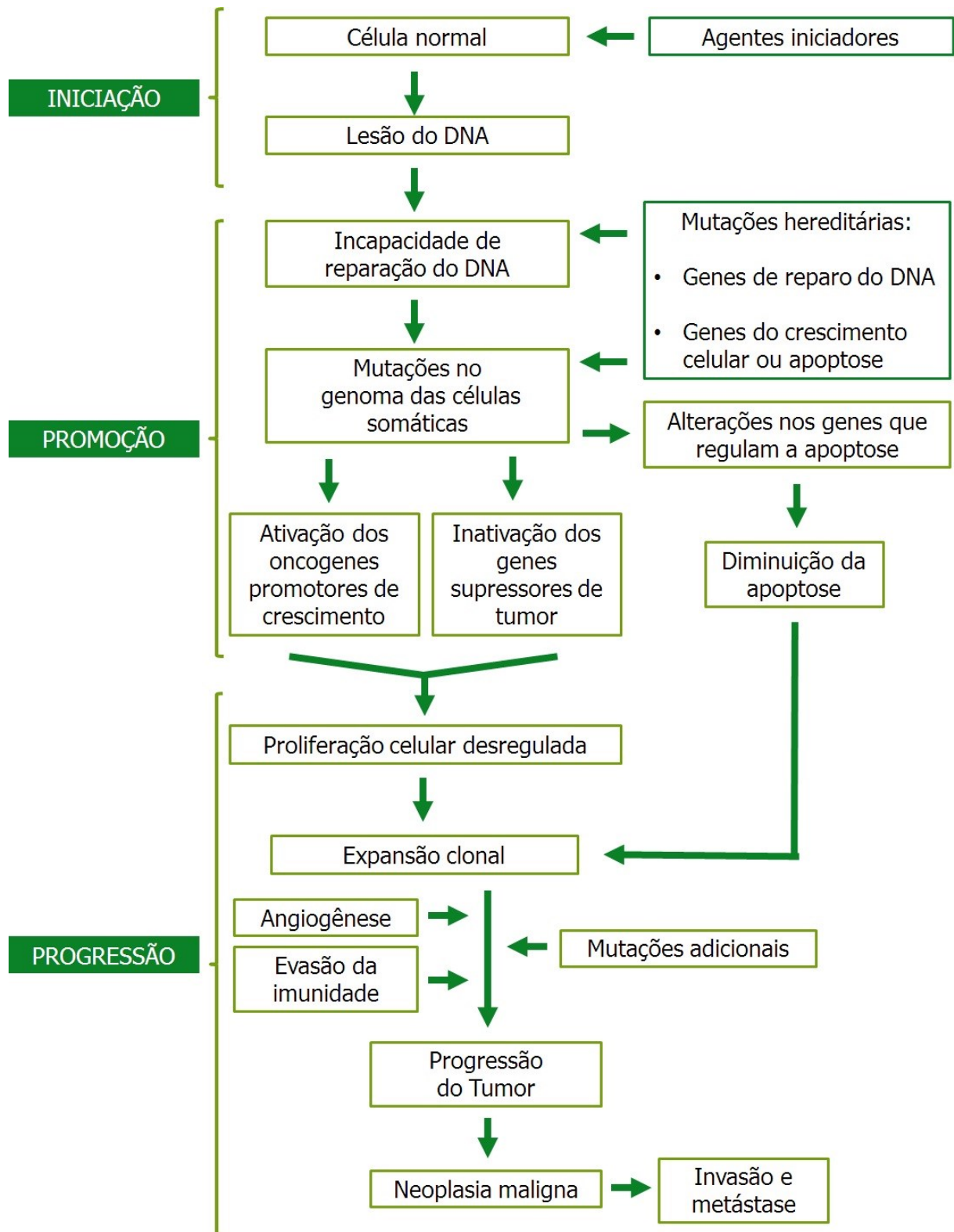
1.1.1. Carcinogênese

Esquematizado no Fluxograma 1, o processo de carcinogênese pode ser definido como uma cascata de eventos que transforma uma célula normal em cancerosa, levando ao desenvolvimento de um câncer. As células cancerosas são, geralmente, menos especializadas nas suas funções do que as suas correspondentes normais, e, conforme vão substituindo-as, os tecidos invadidos vão perdendo suas funções. A carcinogênese possui múltiplos estágios desencadeados por danos genéticos, podendo-se descrever pelo menos três principais, que mostram eventos cronológicos sequenciais deste processo. São eles: iniciação, promoção e progressão (Yuspa, 2000; Bogliolo & Brasileiro Filho, 2006).

Os agentes iniciadores do câncer têm origem variada, podendo esta ser externa ou interna ao organismo. As causas externas referem-se ao meio ambiente e aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. As internas são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão ligadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas (INCA, 2011).

Acredita-se que os agentes iniciadores alterem de modo irreversível a composição ou estrutura básica do DNA nuclear de uma célula e, com esse processo, dêem partida ao desenvolvimento do câncer. A célula que sofre mutação passa a ter uma resposta alterada em seu microambiente e uma vantagem seletiva de proliferação. Atualmente, a exposição a esses agentes em potencial é inevitável e seus efeitos podem ser aditivos (Bogliolo & Brasileiro Filho, 2006).

Durante a vida de um indivíduo, muitas de suas células sofrem o processo de iniciação, contudo nem todas evoluem para uma possível neoplasia, podendo ser neutralizadas por mecanismos imunológicos ou por mecanismos fisiológicos que levam à apoptose (Surth, 2003).



Fluxograma 1. Resumo das etapas que culminam no desenvolvimento de um câncer.

Uma única mutação em um único gene não é suficiente para causar câncer. Normalmente, os atributos fenotípicos característicos de malignidade desenvolvem-se quando múltiplas mutações envolvendo múltiplos genes se acumulam, e os genes mais comumente afetados são os que regulam a proliferação celular (proto-oncogenes e genes supressores de tumor) e, também, os que regulam a apoptose e o reparo do DNA celular. O acúmulo gradual de mutações e o aumento da malignidade são relatados como progressão tumoral (Kumar et al., 2008).

O estágio de promoção do câncer envolve a alteração da expressão do gene, a expansão clonal seletiva e a proliferação da célula que sofreu o processo de iniciação. Esse estágio resulta assim em um conjunto de células tumorais (Weinberg & Hanahan, 2000).

A progressão, sendo este o último estágio da carcinogênese, é caracterizada por alterações moleculares adicionais, aumento maior da massa tumoral primária, desprendimento de células dessa massa, movimento na direção de tecidos e órgãos adjacentes e a penetração de células neoplásicas individuais ou pequenos agrupamentos das mesmas no sistema circulatório e aprisionamento em órgãos e tecidos distantes. Estes grupos de células que ficam retidos costumam fixar-se nos novos locais e continuam a proliferar, processo conhecido como metástase (Yokota, 2000; Bogliolo & Brasileiro Filho, 2006).

Portanto, uma célula de tumor diferencia-se de uma célula normal pela sua imortalidade, pela sua transformação morfológica e, às vezes, pela sua capacidade de formar metástases.

1.1.2. Mecanismos de controle da carcinogênese

1.1.2.1. Imunológicos

As células tumorais podem se esquivar dos mecanismos de defesa do organismo através de modificações, como a falta de produção de antígenos tumorais, mutações nos genes necessários para o processamento de antígenos ou pela produção de proteínas imunossupressoras. O clone de células transformadas expressa antígenos que são reconhecidos como estranhos pelo sistema imunológico do organismo. Esta resposta imunológica pode ser natural ou adquirida, sendo que na primeira participam as células *natural killers* (NK), que destroem muitos tipos de células tumorais. Sua capacidade de destruição é aumentada pelas citocinas, incluindo interferons e interleucinas (IL-2 e IL-12). Os macrófagos também participam dessa resposta e são células que, quando ativadas,

destroem com muito mais eficiência as células tumorais comparada com as células normais (Abbas et al., 2008).

Já na resposta adquirida, o principal mecanismo de imunidade tumoral é a destruição das células por células citolíticas da linhagem T que expressam a proteína CD8 na membrana, que desempenham função de vigilância ao reconhecerem e destruírem células potencialmente malignas que expressam antígenos. Outro mecanismo dessa resposta se dá através da produção de anticorpos, que podem destruir as células tumorais por meio da ativação do sistema complemento (Kumar et al., 2008).

1.1.2.2. Apoptose

Definida por Kerr, Wyllie e Curie (1972), apoptose, ou morte celular programada, é um processo essencial para a manutenção da homeostase nos seres vivos. O termo é derivado do grego, que se referia à queda das folhas das árvores no outono - um exemplo de morte programada fisiológica e apropriada que também implica em renovação. Este evento ocorre em diversas situações fisiológicas, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na involução cíclica dos órgãos reprodutivos da mulher, na resposta inflamatória, na eliminação de células após dano por agentes genotóxicos e, ainda, na regressão de tumores (Franks & Teich, 1998; Meier et al., 2000).

Durante a apoptose, a célula sofre inúmeras alterações morfológicas que podem ser divididas em cinco etapas: na primeira, a cromatina, inicialmente esparsa e em transcrição, começa um processo rápido de condensação e inativação, levando à formação de grumos grosseiros de heterocromatina no interior do núcleo, com alguma alteração do limite nuclear. A inativação do material genético leva ao desmonte do citoesqueleto e sua desorganização, fazendo com que a célula deforme seus contornos e desfaça suas junções, protegendo as células vizinhas da transferência involuntária de resíduos tóxicos que poderiam causar lesão ou morte. No citoplasma, progride o empacotamento de organelas pelo retículo endoplasmático e podem surgir vacuolizações. Já na segunda etapa, o transporte celular cessa, a célula retrai, seu citoplasma torna-se cada vez mais denso e mais corado, e seus limites celulares e nucleares mostram-se irregulares. Há uma intensa condensação da cromatina, que pode mostrar-se em corpúsculo único e densamente heterocromático, ou assumir posição marginal, em anel ou em forma de capuz. Diz-se que o núcleo está picnótico ou em picnose.

Durante a terceira etapa, o núcleo colapsa e enruga profundamente, segmentando-se em pequenas esferas, ou corpúsculos heterocromáticos, para o interior do citoplasma,

processo este denominado cariorréxis. Na etapa seguinte, o citoplasma da célula inicia uma fragmentação progressiva, englobando os fragmentos nucleares em porções de seu citoplasma que se desprendem da superfície celular, formando os chamados corpos apoptóticos em fenômeno denominado cariólise. Na quinta e última etapa, segue-se uma remoção dos restos celulares da célula que sofreu apoptose por fagocitose das células vizinhas, geralmente por macrófagos. Este tipo de autodestruição exerce um papel oposto ao da mitose (Edinger & Thompson, 2004).

Uma característica bioquímica particularmente importante deste processo refere-se à externalização de resíduos de fosfatidilserina na membrana plasmática dos corpos apoptóticos, o que permite o reconhecimento dos mesmos por células fagocíticas (Martin et al., 1995).

Como mencionado anteriormente, o processo carcinogênico inclui um desequilíbrio entre proliferação e morte celular, através de mutações nos genes que regulam a apoptose que, como consequência, acarretará em uma proliferação celular desregulada e, geralmente, leva a instalação de um câncer. Assim, sabendo-se que a apoptose é um mecanismo inato de defesa antineoplásica e que inúmeros agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular, seus mecanismos moleculares tornam-se alvo de investigação para contribuir na terapêutica do câncer (Nicholson, 2000).

1.1.3. Tipos de câncer

Os tipos de câncer são classificados de acordo com as células que acometem e, neste sentido, existem quatro grandes grupos: sarcomas, carcinomas, linfomas e leucemias.

O sarcoma é um tipo de câncer que se origina dos tecidos conjuntivos, como ossos e cartilagens, ou tecidos musculares. Já o carcinoma se origina de células que formam a epiderme ou tecidos que revestem órgãos internos.

Os linfomas, por sua vez, são tumores do sistema linfático, tendo início nos linfonodos ou em aglomerados de tecidos linfáticos presentes em órgãos como o estômago e os intestinos. Leucemia, por sua vez, é um tipo de câncer que acomete as células da hematopoiese sanguínea (Kumar et al., 2008).

1.1.3.1 Leucemias

A medula óssea ocupa a cavidade central dos ossos do esqueleto axial de um indivíduo adulto e é onde ocorre o desenvolvimento de células sanguíneas que circulam no sangue, cujo processo de formação é chamado hematopoiese. Um pequeno grupo de células, denominadas células-tronco hematopoiéticas, é responsável por produzir todas as células sanguíneas no interior da medula óssea por meio de um processo de diferenciação (Kumar et al., 2008).

As leucemias são decorrentes da transformação maligna de uma célula do sistema hematopoiético. Geralmente, essa transformação ocorre em células imaturas, mas em alguns casos pode acometer uma célula com a capacidade de diferenciação mais limitada. Portanto, seu desenvolvimento depende, fundamentalmente, do grau de diferenciação da célula maligna e sua subsequente expansão clonal, apresentando características fenotípicas e transformações genéticas próprias da modificação deste clone (Liu & Robins, 2006).

Têm como principal característica o acúmulo de células anormais na medula óssea, que substituem as células sanguíneas normais. Diferenciam-se dos demais tipos de câncer do ponto de vista de sua evolução, uma vez que, para a sua disseminação, não são necessários os mecanismos de angiogênese, ruptura estrutural e de formação de metástase, comuns aos demais (Franks & Teich, 1998).

São classificadas de acordo com o tipo e o grau de maturação das células. Podem ser mielóides ou linfóides, de acordo com o tipo celular envolvido; e, de acordo com o grau de maturação celular, podem ser patologias agudas ou crônicas. Dessa forma, os principais tipos de leucemias são: leucemias mielóides e linfóides, ambas de caráter agudo ou crônico. As leucemias agudas são caracterizadas por uma progressão rápida e afetam a maioria das células imaturas da medula óssea (ainda não totalmente diferenciadas ou desenvolvidas), que perdem sua capacidade de produzir células sanguíneas saudáveis. Essas células, multiplicando-se e acumulando-se na medula óssea, acabam por impedir que sejam produzidas as células sanguíneas normais. Podem ocorrer em adultos jovens e crianças e o tratamento deve ser imediato, pois com o acúmulo, as células leucêmicas podem se espalhar para outras partes do corpo, congestionando o sistema circulatório e comprometendo severamente a saúde do paciente (Liu & Robins, 2006).

As leucemias crônicas, por sua vez, progridem mais lentamente que as agudas, às vezes por meses ou até anos, e permitem a proliferação de maior número de células relativamente maduras, porém, ainda assim, anormais (Lee et al., 1999).

Embora as causas para o desenvolvimento de leucemia ainda não sejam bem conhecidas, existem evidências para alguns fatores de risco, como exposição à radiação ionizante ou medicamentos utilizados em quimioterapia para o câncer e exposição ocupacional ao benzeno, por exemplo. Os primeiros indícios de que a exposição à radiação ionizante ocasionava o desenvolvimento de leucemia foram de estudos realizados após os bombardeios de Hiroshima e Nagasaki (INCA, 2011).

1.1.3.2. Câncer do colo do útero

O câncer do colo do útero é um problema de saúde pública no mundo. Sua incidência é cerca de duas vezes maior em países menos desenvolvidos quando comparada aos mais desenvolvidos. Estimativas mundiais o classificam como sendo o terceiro tipo de câncer mais comum entre as mulheres. É uma neoplasia que se manifesta desde jovens na faixa dos 20 anos, aumentando seu risco rapidamente até atingir o pico etário nos 55 anos (INCA, 2011).

A infecção pelo vírus HPV é o principal fator de risco para o desenvolvimento de lesões intraepiteliais de alto grau e do câncer do colo do útero, porém, a infecção pelo HPV por si só não representa uma causa suficiente para o surgimento dessa neoplasia; outros fatores ligados à imunidade, à genética e ao comportamento sexual podem influenciar os mecanismos ainda incertos que determinam a regressão ou a persistência da infecção e, também, a progressão para um câncer (Stephen et al., 1996).

1.1.3.3. Câncer de cólon e reto

No Brasil, o câncer de cólon é o segundo tumor maligno mais frequente na região Sudeste, sem considerar os tumores de pele não melanoma, e em todo o mundo entre as mulheres, ficando atrás somente do câncer de mama (INCA, 2011).

A história familiar de câncer de cólon e a predisposição genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino configuram-se como os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento desse tipo de neoplasia (Perez et al., 1998). Além disso, os casos esporádicos, que são os que ocorrem sem um caráter familiar, correspondendo à cerca de 85% dos casos, estão altamente relacionados a dietas baseadas em alto consumo de gorduras animais, baixa ingestão de frutas, vegetais e cereais, assim como consumo excessivo de álcool e tabagismo, hábitos de vida que corroboram com a estatística que revela que cerca de 60% destes casos ocorrem em regiões mais desenvolvidas. A idade

também é considerada fator de risco, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade eleva-se com o seu aumento (Ransohoff, 2005).

1.1.3.4 Neuroblastoma

O neuroblastoma é o tumor sólido mais comum em crianças com idade até cinco anos e o responsável por 15% de todas as mortes causadas por câncer na infância. Esta neoplasia deriva dos precursores simpáticos neurais primitivos, podendo ser originários da medula adrenal e dos gânglios simpáticos paraespinais ou pélvicos (Brodeur, 2003).

Sua etiologia é desconhecida na maioria dos casos e a exposição a fatores ambientais mostra-se irrelevante no seu aparecimento, ainda que alguns estudos a tenham correlacionado com o uso de hidantal, fenobarbital e álcool durante a gestação das crianças acometidas (Michaleck et al., 1996).

1.1.4. Epidemiologia do câncer

O câncer é um problema de saúde pública em todo o mundo, tanto nos países desenvolvidos como naqueles em desenvolvimento, sendo responsável por mais de seis milhões de óbitos a cada ano, e representando pouco mais de 10% de todas as causas de morte no mundo (Guerra et al., 2005). A Organização Mundial da Saúde estima que, para o ano de 2030, existam 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas com câncer por ano. Em países com grande volume de recursos financeiros, predominam os cânceres de pulmão, mama, próstata e cólon, e nos de baixo e médio, os cânceres predominantes são os de estômago, fígado, cavidade oral e de colo do útero (INCA, 2011).

No Brasil, desde 2003, as neoplasias malignas constituem-se na segunda causa de morte na população, representando quase 17% dos óbitos de causa conhecida notificados em 2007 no Sistema de Informações sobre Mortalidade (INCA, 2009).

Segundo o INCA, no Brasil, as estimativas para o ano de 2012, válidas também para 2013, apontam a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer. Destes, 257.870 incidirão sobre o sexo masculino, e 260.640 sobre o feminino. Na Figura 1, observa-se a distribuição dessas incidências no território nacional.

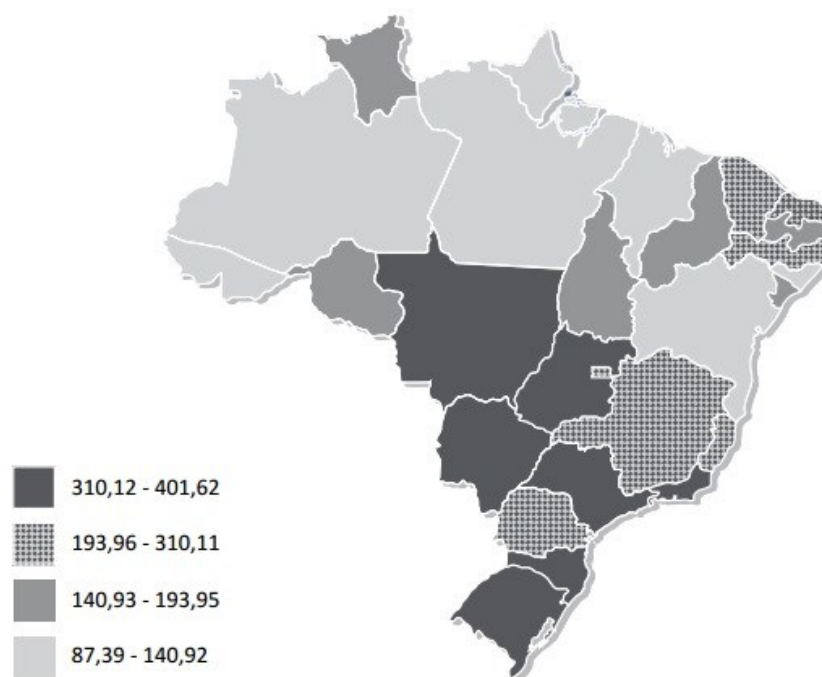


Figura 1. Incidência de câncer no Brasil. Representação espacial das taxas brutas de incidência de todas as neoplasias malignas por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012 (INCA, 2011).

1.2. CÂNCER E PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais no tratamento de diversos tipos de doenças é tradicional na cultura humana e os serviços de saúde e as instituições a eles ligados devem estar voltados para o aproveitamento desse conhecimento tradicional. Cerca de 80% da população dos países de terceiro mundo faz uso de produtos naturais para o tratamento de problemas primários de saúde. Mesmo em países industrializados, grande parte dos produtos farmacêuticos comercializados provém de produtos naturais. Assim, os produtos extraídos de plantas medicinais continuam a representar uma diversidade química única, a qual continuará a ser fonte importante de compostos modelo para programas de investigação clínica iniciados a partir da observação das espécies de plantas regionais popularmente utilizadas (Mans et al., 2000; Mann, 2002).

A utilização de plantas como fonte de produtos eficazes na prevenção, tratamento e controle de doenças é devido, principalmente, aos metabólitos secundários associados aos mecanismos de sobrevivência e de defesa da própria planta. Neste contexto, produtos derivados de plantas medicinais têm sido particularmente benéficos quando aplicados a

enfermidades relacionadas a infecções por micro-organismos diversos, distúrbios metabólicos, de origem imunológica e inflamatória, assim como no combate ao câncer (Phillipson, 2001; Butler, 2004).

A grande diversidade de plantas existentes pode ser considerada uma porta para a descoberta de novas moléculas. Mais de 60% dos agentes anticâncer usados atualmente são derivados direta ou indiretamente de fontes naturais. Para o tratamento de diferentes tipos de neoplasias existem substâncias isoladas ou derivadas de plantas medicinais. Exemplo melhor refere-se aos alcaloides vincristina e vimblastina, ambos utilizados na prática médica e isolados da *Catharanthus roseus*, Apocynaceae (Cragg et al., 1997; Leveque & Jehl, 2007; Magnotta et al., 2007).

Atualmente, o uso de anticorpos monoclonais no tratamento do câncer pode contribuir para superar a toxicidade associada ao uso de alguns produtos naturais. Esta nova terapêutica se dá pela administração de um pró-fármaco inativo do medicamento natural que se liga a um complexo (enzima ligado ao anticorpo), onde a enzima converte o pró-fármaco à droga ativa. Devido à especificidade do anticorpo, que se liga apenas a um antígeno na célula tumoral, o medicamento ativo, que está vinculado diretamente a ele, se liga ao antígeno do tumor. Neste caso, a célula absorve o complexo e, dentro dela, as enzimas liberam o fármaco a partir dos anticorpos e a droga é liberada para exercer o seu efeito tóxico, matando seletivamente as células tumorais (Mann, 2002).

As informações fornecidas pelo Projeto Genoma Humano serão, sem dúvida, úteis para identificar genes-alvos para fármacos anticancerígenos, e as indústrias farmacêuticas tentarão obter estas drogas através do uso da química combinatória, a qual está inserida na utilização de modelos estruturais químicos baseados em produtos naturais, que parte do fato de que a natureza já a realizou e o que se tem a fazer é apenas o refinamento das estruturas. Um bom exemplo é fornecido por um trabalho realizado em que o esqueleto básico de um composto citotóxico, proveniente de um produto natural foi anexado a um suporte sólido e, este, foi utilizado como modelo para a produção de cem novos análogos. A combinação destes teve uma citotoxicidade muito maior do que o composto de origem, e vários foram até cinquenta vezes mais potentes que o taxol (Mann, 2002).

1.3. LINHAGENS TUMORAIS

A existência de uma coleção crescente de linhagens celulares derivadas de tumores, as quais podem ser conveniente e continuamente mantidas *in vitro*, tem favorecido vários tipos

de estudos, incluindo a elucidação de mecanismos de ação de substâncias ativas (Purves et al., 1995).

Um número de fatores referentes a essas substâncias, tais como solubilidade e estabilidade química e metabólica, dentre outros, também pode ser avaliado nesses sistemas, os quais, ao contrário dos ensaios *in vivo*, utilizam quantidades diminutas das substâncias em estudo. Outro aspecto importante é a possibilidade de se observar efeitos em algumas linhagens em detrimento de outras, implicando aspectos de seletividade por um tipo particular de neoplasia.

Denomina-se cultivo celular o processo de se manter *in vitro* uma população de células semelhantes, provenientes de um único tecido ou órgão por algumas horas, dias ou meses em um meio de cultura sintético definido, em condições adequadas de temperatura, osmolaridade e pH. Quando determinadas células podem ser mantidas indefinidamente nessas condições, sem alteração das características basais, só lhes renovando periodicamente o meio de cultura, obtêm-se linhagens celulares. Células com esta capacidade são, geralmente, provenientes de tumores malignos ou resultam de manipulação genética, onde genes que controlam sua proliferação são alterados *in vitro*, permitindo-lhes sobreviver indefinidamente em condições artificiais, mas adequadas. Como citado anteriormente, as linhagens celulares tumorais têm sido instrumento importante no entendimento da carcinogênese.

1.3.1. U-937

A linhagem U-937 é derivada de um paciente do sexo masculino, caucasiano, de 36 anos. Foi estabelecida por Sundstrom e Nillson (1974) a partir de células malignas presentes na efusão pleural desse paciente com linfoma histiocítico generalizado (ATCC.a, 2012). Os caracteres fenotípicos da U-937 refletem sua origem leucêmica; a histoquímica e a morfologia dessas células as tipificam como sendo células imaturas de linhagem mielomonocítica. Além disso, desde 1979, estudos apontam que células U-937 podem ser diferenciadas em monócitos quando estimuladas por vitamina D3, interferon- γ , fator de necrose tumoral ou ácido retinóico (Sundstrom & Nillson, 1976; Harris & Ralph, 1985).

Seu padrão de crescimento é na forma de suspensão (ATCC.a, 2012), porém, quando as células são induzidas a diferenciar, pode ser observado aumento de adesão ao substrato, aumento do tamanho celular, aquisição de lobulação nuclear e seus grânulos citoplasmáticos são substituídos por vacúolos, mimetizando a transformação de monoblasto para monócito. Esta linhagem é extensivamente utilizada em estudos que tentam elucidar os mecanismos de

origem das leucemias, sendo bem caracterizada como uma linhagem monocítica (Harris & Ralph, 1985).

1.3.2. Daudi

A linhagem Daudi é derivada de um paciente do sexo masculino, negro, de 16 anos de idade, acometido pelo linfoma de Burkitt (Klein et al., 1967). Esta linhagem é extensivamente utilizada em estudos que tentam elucidar os mecanismos de origem das leucemias, sendo bem caracterizada como uma linhagem linfoblástica do tipo B (ATCC.b, 2012).

1.3.3. Jurkat

Descrita por Schneider e colaboradores (1977), as células Jurkat provêm de um paciente do sexo masculino de 14 anos de idade, acometido por uma leucemia linfoblástica do tipo T. Essa linhagem é usualmente utilizada na ciência devido a sua habilidade de produzir interleucina-2 (IL-2), citocina originalmente chamada de Fator de Crescimento da Célula T, que atua sobre as mesmas células que a produzem, isto é, funciona como um fator de proliferação autócrina, e estimula a proliferação das células *Natural Killer*, facilitando sua ação citolítica. A IL-2 também age sobre os linfócitos B como estímulo para formação de anticorpos (ATCC.c, 2012).

1.3.4. HeLa

O nome HeLa é a abreviatura do nome Henrietta Lacks, paciente que, em 1951, foi para o hospital relatando a presença de caroços e sangramento vaginal incomum, onde foi diagnosticada com câncer cervical do tipo invasivo, no estágio 1. Como tratamento, foram realizadas sessões de radioterapia, durante as quais o médico cirurgião de plantão coletou, sem o seu conhecimento ou consentimento, amostras sadias e cancerosas da cérvix da paciente. Essas células foram doadas para o primeiro pesquisador a empregar células cancerosas em laboratório, Dr. George Gey, culminando na propagação da primeira linhagem celular humana imortal (Skloot, 2011). Essas células são positivas para queratina pela reação da imunoperoxidase, e contêm a sequência do HPV-18 (Schneider-Gadicke & Schwarz, 1986; ATCC.d, 2012).

As células HeLa são poligonais e costumam proliferar juntas, com crescimento do tipo aderente. Citologicamente, apresentam a aparência típica de células tumorais, exibindo disparidade no tamanho e nos formatos celular e nuclear, com núcleos grandes e múltiplos, muitas figuras mitóticas, frequentemente em configurações anormais. Apesar de geralmente homogêneo, o citoplasma às vezes aparece vacuolizado (Boyer et al., 1957).

1.3.5. HRT-18

A linhagem celular HRT-18, estabelecida por Tompkins e colaboradores (1974), pode ser considerada idêntica a linhagem HCT-8 pelas coleções de células ATCC e CLS – apresentando inclusive a mesma origem genética (Vermeulen et al., 1998) – originou-se do adenocarcinoma ileocecal coloretal de um paciente do sexo masculino, de 67 anos (ATCC.e, 2012; CLS, 2012).

Seu crescimento é do tipo aderente e, em cultura, aparecem como monocamadas polarizadas, com a presença de junções e microvilosidades irregulares na superfície apical da camada celular, remetendo a morfologia de células epiteliais (Chantret et al., 1988; CLS, 2012).

1.3.6. SY5Y

Proveniente de uma criança de 4 anos do sexo feminino, a linhagem SY5Y deriva de um neuroblastoma e foi descrita por Biedler (1978). Peculiaridade observada nesta linhagem é o seu aspecto misto de proliferação, ou seja, apresenta formas em suspensão e aderentes (ATCC.f, 2012).

1.4. LINHAGENS TUMORAIS E A INDUÇÃO DE APOPTOSE POR PLANTAS MEDICINAIS

Diversos estudos vêm sendo realizados com o objetivo de verificar a influência de diferentes plantas medicinais sobre linhagens tumorais, na tentativa preliminar de se identificar agentes antineoplásicos eficientes derivados da natureza. Um exemplo é o extrato de *Bufo melanostictus*, espécie popular na Índia, do qual foram observados efeitos antiproliferativo, citotóxico e apoptogênico nas linhagens U-937 e K562 (Giri et al., 2006). A própolis, apesar de não ser uma planta medicinal, é um produto natural muito utilizado popularmente e apresentou indução de apoptose em células da linhagem U-937 através da diminuição da expressão da proteína Bcl-2, responsável por inibir a apoptose das células,

enquanto que a Bax, proteína que promove a indução da apoptose, teve sua expressão inalterada (Motomura et al., 2008). Os extratos hidroetanólicos das espécies presentes na flora brasileira *Himatanthus lancifolius*, Apocynaceae; *Casearia sylvestris*, Flacourtiaceae; *Rauvolfia sellowii*, Apocynaceae e *Bauhinia microstachya*, Caesalpiniaceae, conhecidas popularmente como agoniada, guaçatonga, pau-pra-tudo e escada-de-macaco, respectivamente, exerceram efeito citostático sobre as linhagens HL-60, K-562, Daudi e Reh (Lima, 2008).

Na busca da identificação de substâncias que possam atuar como quimioterápicos em células tumorais utiliza-se o refinamento dos extratos de plantas medicinais com o fracionamento e posterior isolamento de compostos químicos, como o extrato bruto de *Camellia sinensis* var. *assamica*, Theaceae (chá-verde), testado nas linhagens leucêmicas U-937 e K-562, que demonstrou ser ativo na inibição da proliferação celular, indicando duas saponinas isoladas como sendo as responsáveis pelo efeito (Ghosh et al., 2006), justificando o consumo popular do chá-verde e sua relação com a prevenção do câncer, relatada por Jankun e colaboradores (1997). Estes resultados serviram de estímulo para diversos estudos epidemiológicos subsequentes sobre o chá-verde, onde foram avaliados pacientes com câncer de mama (Inoue et al., 2001) e de próstata (Kurahashi et al., 2007).

Exemplo de uma fração que induziu apoptose em células de câncer de cólon da linhagem SW 480 é a fração HS7, da espécie *Taiwanofungus camphoratus*, Incertae sedis (Yeh et al., 2011). Em relação às substâncias isoladas, o triterpenoide metil angolensato, isolado do caule de *Soyimida febrifuga*, Meliaceae, conhecida na Índia como árvore da madeira vermelha, apresentou efeito citotóxico em ensaios com a linhagem Daudi, e a indução de apoptose nas células através da via mitocondrial (Chiruvella & Raghavan, 2011).

Alguns dos ensaios mais clássicos utilizados atualmente para avaliação da apoptose em células tumorais incluem a detecção das mudanças morfológicas celulares por microscopia de luz e eletrônica ou através da citometria de fluxo, dentre outros métodos, usando corantes nucleares como o Cristal Violeta ou corantes fluorescentes (Dive et al., 1992; Koopman et al., 1994). Por exemplo, para o ácido ursólico, presente em uma grande variedade de alimentos, ervas medicinais e plantas, foi relatado diminuir a viabilidade de células Daudi e induzir mudanças morfológicas celulares características de apoptose (Lauthier et al., 2000).

Muitas plantas exercem efeito anti-proliferativo, reduzindo a viabilidade e inibindo a proliferação de linhagens celulares tumorais através da indução do processo de apoptose. Por exemplo, a hidrazina agaritina isolada da *Agaricus blazei*, Agaricaceae, espécie popularmente utilizada para o tratamento do câncer, apresentou efeito citotóxico e indutor

de apoptose na linhagem U-937 (Akiyama et al., 2011), mesma atividade observada nos extratos preparados das folhas de *Origanum majorana*, Lamiaceae, sobre células leucêmicas Jurkat (Abdel-Massih et al., 2010).

Células HeLa, quando expostas ao extrato das sementes de *Nigella sativa*, Ranunculaceae, tiveram a expressão dos genes pró e anti-apoptóticos regulados, indicando potencial agente terapêutico para o câncer do colo do útero (Shafi et al., 2009). Em células HCT-116 de câncer de cólon e reto, o extrato dos frutos de *Garcinia mangostana*, Clusiaceae, rico em xantonas, apresentou atividade citotóxica dose-dependente e indução de apoptose comprovada por ativação das caspases 3 e 7, fragmentação do DNA, condensação da cromatina e perda do potencial de membrana mitocondrial (Aisha et al., 2011). Algumas saponinas da *Ilex paraguariensis*, Aquifoliaceae, erva-mate muito utilizada popularmente no Brasil, também apresentaram significativa ação apoptótica por indução da caspase 3 em células de câncer de cólon HT-29 (Puangraphant et al., 2011).

Estudo recente realizado com a linhagem de neuroblastoma SY5Y demonstrou que o alcaloide vincristina, isolado da *Catharanthus roseus*, Apocynaceae, e já comumente utilizado como quimioterápico na prática médica, apresentou efeito indutor de apoptose pela expressão das caspases 3 e 9, comprovando mais um de seus mecanismos de ação, além da inibição do fuso mitótico, até então não descrito (Tu et al., 2012).

1.5. *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., LYTHRACEAE

A família Lythraceae pertence à ordem Mystales, subclasse Rosidae, classe Magnoliopsida e divisão Magnoliophyta. Nesta família têm-se estudos sobre a presença de mucilagens, taninos e alcaloides derivados da piperidina, piridina e quinolizidina (Cronquist, 1981). Quercetina-3-*O*-glucosídeo e canferol-3-*O*-glucosídeo são flavonoides presentes em algumas espécies dos gêneros *Cuphea*, *Diplusodon* e *Lafoensia* (Salatino et al., 2000).

O gênero *Lafoensia* compreende árvores e arbustos, cujas folhas são opostas cruzadas, coriáceas e brilhantes na face adaxial ou superior. Suas flores são organizadas em inflorescências e as pétalas, brancas ou amarelas, são inseridas na borda do tubo. Os frutos são do tipo cápsula, com deiscência irregular e as sementes, aladas e numerosas (Mundo, 2007).

A espécie *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. é conhecida popularmente como dedal, dedaleira-amarela, dedaleiro, mangava-brava, pacuri e pacari. O termo “pacari” é de origem tupi-guarani, e significa “árvore de madeira preciosa” (Proença et al., 2000). Como ilustrada na Figura 2-A, são árvores que medem até 18 m de altura, com tronco de 30 a 60 cm de

diâmetro, que se encontram disseminadas no cerrado brasileiro, em florestas de altitude e na arborização de ruas (Guarim-Neto, 1987; Lorenzi, 1998; Barreira, 2000; Silva Júnior, 2005).

Nativa do segundo maior bioma brasileiro, o cerrado, que cobre cerca de 23% do território do país, demonstra ser adaptada às condições físicas desse solo (Brannstrom et al., 2008). No entanto, as condições ambientais em que se encontra refletem nas variações de altura, ocasionando menor desenvolvimento dos espécimes nesta região (Tonello, 1997). Ocorre com uma frequência aproximada de 49% em dez estados do Brasil, desde a Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Piauí, Rondônia até o Tocantins (Ratter et al., 2001).

É uma planta decídua que floresce durante os meses de outubro a dezembro, ocorrendo a maturação dos frutos de abril a junho. Produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis de dispersão ampla, porém descontínua, nunca formando grandes populações (Lorenzi, 1998). As folhas são curto-pecioladas ou sésseis, coriáceas, de 8 a 15 cm de comprimento, elípticas, obtusas, de coloração verde escura na superfície superior e verde clara na inferior (Figura 2-C). As flores são brancas, dispostas em panículas, e costumam ser polinizadas por morcegos e mariposas. Os frutos são do tipo cápsula cônica, lenhosa e relativamente grande, em forma de dedal, de onde advém seu nome popular (Corrêa, 1984; Lorenzi, 1998).

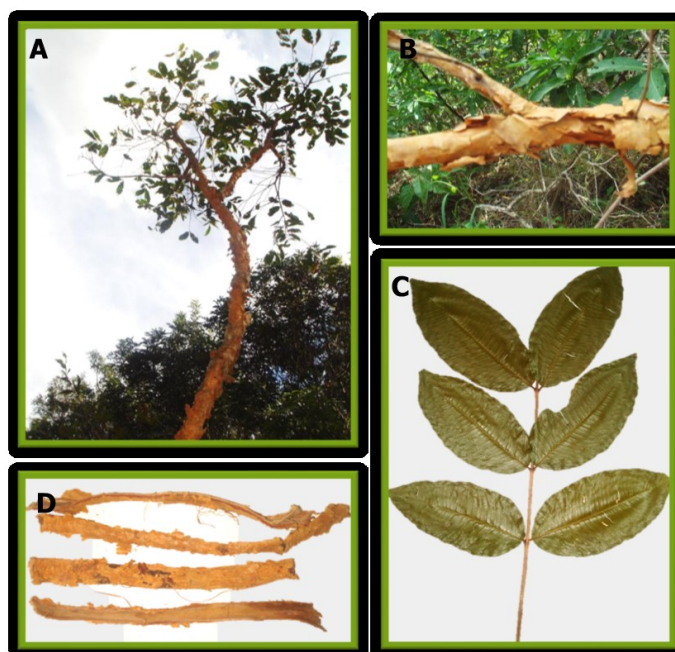


Figura 2. *Lafoensia pacari*: detalhes da planta. Árvore (A), caule (B), folhas (C) e cascas do caule (D).

1.5.1. Aspectos químicos e farmacológicos

Atualmente observa-se maior busca por agentes farmacologicamente ativos presentes na *L. pacari*. Foi constatada na espécie a presença de saponinas, taninos, esteroides, triterpenoides e flavonoides no cerne e nas cascas do caule (Tamashiro Filho, 1999; Solon, 1999). O extrato das folhas contém alguns flavonoides, como o canferol-3-*O*-glucosídeo, os 3-*O*-glucosil-glucosídeos do canferol e da quercetina, e os 3-*O*-glicosídeos da quercetina (galactosídeos, glucosídeo e glucosil-xilosídeo) (Santos et al., 2000).

Estudos *in vitro* demonstraram as propriedades antifúngicas de diferentes extratos e frações da droga vegetal (Silva Júnior et al., 2009). Outras análises revelaram ação antimicrobiana em micro-organismos patogênicos presentes na alveolite (Melo Júnior et al., 2000). O extrato etanólico das folhas e caule é efetivo contra *Staphylococcus aureus*, cuja ação antibiótica foi explicada pela presença de antraquinonas, flavonoides, saponinas e taninos (Lima et al., 2006). Propriedades antidepressivas também foram evidenciadas em ratos usando o extrato etanólico e suas frações (Galdino et al., 2009; 2010).

Os extratos preparados da entrecasca de *L. pacari* em diclorometano e em etanol (Silva et al., 2009), assim como o extrato da raiz, mostraram atividades potentes e seletivas contra leveduras e bactérias, indicando ser potencial candidata para o desenvolvimento de novas estratégias no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas (Lima et al., 2006).

Foram investigados efeitos curativos e preventivos do extrato etanólico de *L. pacari* em lavado brônquio-alveolar de ratos que tiveram asma induzida com albumina do ovo, mostrando resultados efetivos na supressão da inflamação mediada por eosinófilos, sugerindo ação em potencial para o tratamento de alergias (Rogerio et al., 2007).

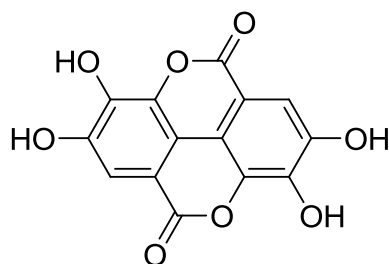
A raiz é utilizada na medicina popular como tônica e febrífuga (Corrêa, 1984) e o caule é empregado como cicatrizante, cuja ação anti-inflamatória parece ser relacionada a redução dos níveis de IL-5, quando injetado em ratos infectados com *Toxocara canis* (Guarim Neto, 1987; Tonello, 1997; Silva Júnior, 2005; Rogerio et al., 2003; 2008; 2010).

Essa espécie é usada popularmente para emagrecimento, cicatrização de feridas, tratamento de coceiras, diarreia, dores de estômago, gastrite e úlceras (Tonello, 1997; Solon, 1999; Tamashiro Filho, 1999; Solon et al., 2000; Melo Júnior et al., 2002; Silva Júnior, 2005; Bieski et al., 2012; Tamashiro Filho et al., 2012). Há registros da utilização dos frutos no tratamento de pneumonia pelas populações indígenas Kaiowá e Guarani na reserva de Caarapó, Mato Grosso do Sul (Bueno et al., 2005).

No caule dessa espécie foram observadas diversas ações de acordo com o extrato utilizado. No extrato bruto, foi observada a presença de substâncias fenólicas, esteroides e

saponinas. Dentre os compostos fenólicos encontrados, está o ácido elágico (**1**), substância com atividades antioxidante (Festa et al., 2001; Hayes et al., 2011) e inibitória contra *Helicobacter pylori* (Chung, 1998). O extrato metanólico de cascas do caule possui atividade anti-radicalar pela inibição da enzima xantina-oxidase (Solon et al., 2000).

O estudo fitoquímico das cascas indicou presença marcante de ácido elágico (**1**) e taninos relacionados, havendo ~14% dessa classe química no extrato bruto ensaiado pelo método de Folin-Ciocalteu (Solon, 1999). Realizando fracionamento químico biomonitorado através de ensaios de atividade antioxidante, Tamashiro Filho (1999) e Solon (1999) afirmaram ser o ácido elágico o marcador químico e o responsável pela potente ação antioxidante de cascas de *L. pacari*, coletadas no Brasil e no Paraguai.



1

Solon (1999) registrou o emprego medicinal dessa droga vegetal no oeste do Paraguai, onde é conhecida como "morosyvó" e empregada oralmente como decocto para o tratamento de câncer. De fato, moradores da área de coleta desta planta (MS) indicam as cascas do caule de *L. pacari* para prevenção e tratamento de pessoas diagnosticadas com câncer. Essa informação também está presente em estudo etnofarmacológico recentemente publicado sobre plantas medicinais utilizadas como agentes antitumorais (Melo et al., 2011).

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito do extrato e frações das cascas do caule de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, em linhagens celulares tumorais.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade *in vitro* do extrato e frações das cascas do caule de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. sobre as linhagens U-937, Daudi, Jurkat, HeLa, HRT-18 e SY5Y, e células MNC isoladas de medula óssea de camundongos e de sangue periférico humano.
- Realizar estudos que elucidem os mecanismos de ação do extrato e frações de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os sais e reagentes utilizados neste trabalho são de procedência Merck, Sigma ou Reagen, salvo indicação contrária. Para o preparo das soluções, utilizou-se água ultrapura obtida pelo sistema MilliQ. Os ensaios com células foram realizados sob condições de esterilidade em câmara de fluxo laminar vertical TROX, modelo FLVQ TAM 12. As soluções foram preparadas e, em seguida, esterilizadas por calor úmido (autoclavação a 121 °C, 15 min, 1 atm) ou por filtração (filtros de acetato de celulose ou poliétersulfona, com poros de 0,22 µm de diâmetro) e, posteriormente, armazenadas em temperaturas apropriadas para sua conservação (temperatura ambiente, 4-8 °C, -10 °C ou a -25 °C), ao abrigo de luz, conforme indicado.

3.1. SOLUÇÕES

- Solução estoque a 1% (v/v) de ácido elágico e do extrato e frações de *L. pacari*
Ácido elágico (Sigma), e o extrato e frações de *L. pacari* foram diluídos em DMSO (10%) e sonificados por 30 min, resultando em uma solução final a 1% (v/v) em meio de cultivo RPMI 1640. Em seguida, esta solução foi centrifugada a 400 x *g* por 5 min para separação de material particulado. A seguir, o sobrenadante foi esterilizado por filtração usando membrana de poliétersulfona, com poros de 0,22 µm de diâmetro, em alíquotas de 1 mL, armazenadas em tubos Eppendorf, que foram mantidos a -25 °C até o momento do uso.
- Solução salina tamponada com fosfatos (PBS)
A solução tampão foi preparada dissolvendo-se NaH₂PO₄.2H₂O (150 mmol/L), NaH₂PO₄ (150 mmol/L) e NaCl (154 mmol/L) em água. Após ajuste do pH para 7,2-7,4 com solução de NaOH 1N, procedeu-se a esterilização por autoclavação e armazenamento a 4-8 °C.
- Meio RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute)
Meio de cultivo RPMI 1640 (Himedia, Japão) foi dissolvido em água, conforme instruções do fabricante para o preparo de um litro, e suplementado com 200 mM de bicarbonato de sódio, 0,3 g de penicilina G e 100 mg/mL de sulfato de estreptomicina. O pH 7,2 foi ajustado com solução de NaOH 1N. O meio foi esterilizado por filtração e armazenado a -10 °C. Quando em uso, foi armazenado a 4-8 °C por, no máximo, 14 dias. Para a

manutenção das linhagens celulares, RPMI 1640 foi suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (SBF) inativado (Cultilab, Campinas/SP). Para os diferentes ensaios, foi suplementado com 1% desse mesmo soro.

- Meio com PHA

Meio para Cariótipo Comercial (Cultilab, Campinas/SP), contendo PHA em RPMI 1640, HEPES e soro fetal bovino; conservado a temperatura de -20 °C e ao abrigo de luz, conforme instruções do fabricante.

- Solução de Tripsina-EDTA a 0,05%

Tripsina (Worthington Biochemical Corporation), 195 U/mg de proteína, foi dissolvida na proporção 1:400 em PBS. A solução foi diluída na proporção 1:5 com PBS contendo 0,02 g de EDTA dissódico, obtendo-se uma solução de tripsina a 0,05%, a qual foi esterilizada através de filtração por membrana de acetato de celulose de 0,22 µm de diâmetro de poro, e mantida a -25 °C até o uso.

- Solução de Azul de Trypan a 0,4% (p/v)

Azul de Trypan em pó foi diluído em PBS, resultando em uma solução a 0,4%.

- Solução Tampão de lise

Preparou-se tampão 0,1 M Tris-HCl, pH 7,2 em água ultra pura, o qual foi adicionado de 1% de Nonidet P-40, 0,01% de SDS, 100 µM de PMSF (fluoreto de fenil-metil-sulfonil) e 1 µg/mL de aprotinina. A solução foi esterilizada através de filtração por membrana de acetato de celulose de 0,22 µm de diâmetro de poro, aliqotada e mantida a -25 °C.

- Tampão de ligação 1x

O tampão de ligação, composto por Hepes 0,01 M (pH 7,4), NaCl 0,14 M e CaCl₂ 0,25 mM em água, conforme instruções do fabricante (BD Pharmingen Biosciences), foi utilizado nos ensaios para avaliação da apoptose e necrose. A solução foi mantida refrigerada até o momento do uso.

3.2. MATERIAL BOTÂNICO

Cascas do caule de *Lafoensia pacari* A.St.-Hil., Lythraceae, foram coletadas no estado de Mato Grosso do Sul, na Fazenda da Mata, município de Maracaju, situada a 151 km de

Campo Grande (MS), com coordenadas 21°45'37.4"S,55°21'81.9"W (Figura 3), no dia 3 de maio de 2011. A identificação botânica foi realizada pelo Herbário Per Karl Dusén, pertencente à Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Curitiba, Paraná. Um exemplar encontra-se depositado neste estabelecimento sob o número MBM11065. A coleta deste material botânico está sob o número de registro 29123-1 no SISBIO (Anexo A). As cascas, previamente deixadas à TA por cinco dias para secagem, foram submetidas à secagem final à temperatura de 60 °C por três dias e, depois, trituradas utilizando moinho de facas até a obtenção de um pó fino com mesh de 0,425 mm.



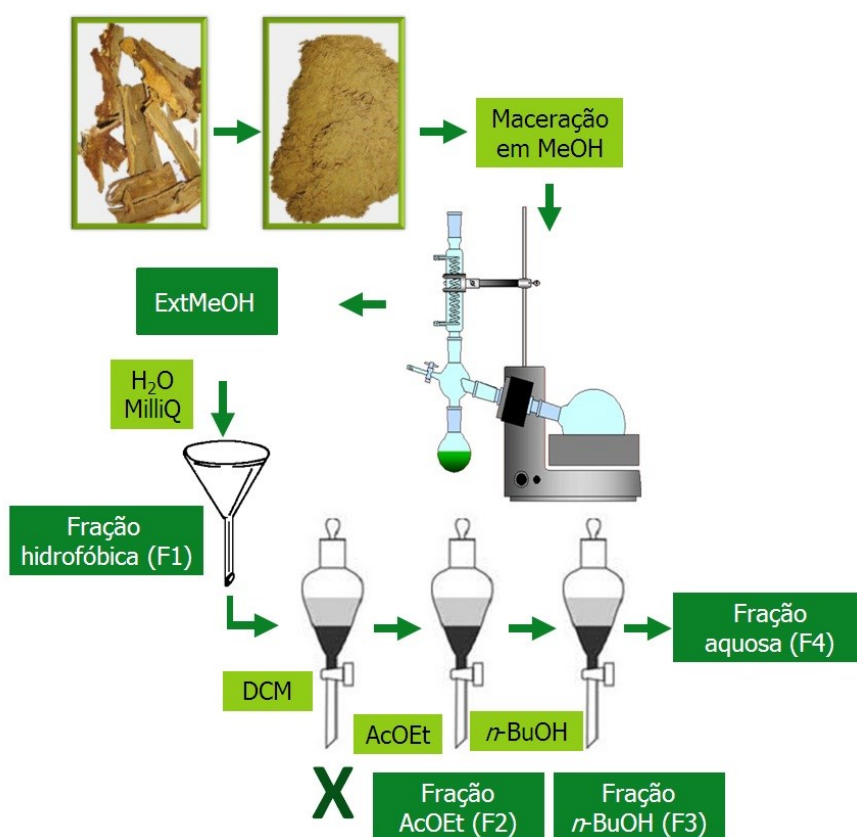
Figura 3. Local de coleta das cascas do caule de *Lafoensia pacari*. Em destaque o bioma cerrado brasileiro.

3.2.1. Extrato

Para a extração de substâncias das cascas do caule utilizou-se 300 g do pó da droga em maceração exaustiva com MeOH por 72 h. O material foi filtrado e concentrado até a obtenção de 500 mL de extrato fluido. Este foi desengordurado com *n*-hexano por partição líquido/líquido, para retirada de elementos apolares. A partição metanólica foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida a 60 °C até seca, e assim, conservada a 4-8 °C para utilização nos fracionamentos e nos experimentos biológicos *in vitro*.

3.2.2. Frações

O extrato metanólico bruto, 60 g, suspenso em 900 mL de água MilliQ e mantido em banho de gelo sob agitação por 8 h deu origem à fração hidrofóbica (F1). O solubilizado em água foi submetido à fracionamento utilizando DCM, AcOEt e *n*-BuOH, em funil de separação (3x 100 mL) por partição líquido/líquido, conforme esquema ilustrado na Fluxograma 2. Todas as frações foram concentradas em rotaevaporador sob pressão reduzida a 60 °C, dessecadas em pistola de Abderhalden, com P₂O₅ como agente dessecante e CHCl₃ como líquido trocador de calor, a 80 °C por 8 h. Secas, as frações foram caracterizadas através de CCD, em placas de sílica gel, com fase móvel CHCl₃:ácido acético glacial:MeOH:acetona (2:1:1:1).



Fluxograma 2. Preparo do ExtMeOH e das frações de *Lafoensia pacari*.

3.2.3. Cromatografia em camada delgada

Placas de alumínio para cromatografia de gel de sílica 60 F254 (Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,2 mm de espessura. As cromatografias do extrato e frações foram observadas em câmara de luz UV ondas largas (365 nm) e ondas curtas (254 nm), após serem borrifadas com solução de ácido fosfomolibdico 10% em EtOH, preparado segundo Wagner & Bladt (1996) e usado como revelador.

3.3. ENSAIOS BIOLÓGICOS *in vitro*

3.3.1. Manutenção das linhagens tumorais

As linhagens U-937, Daudi e Jurkat foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro, UFRJ; as linhagens HeLa e HRT-18 foram gentilmente cedidas pela Prof.^a Dr.^a Katia Sabrina Paludo, do Departamento de Biologia Estrutural, Molecular e Genética, UEPG, e a linhagem SY5Y foi gentilmente cedida pelo pesquisador Róber Freitas Bachinski, do Centro de Ciências Médicas, UFF. As linhagens tumorais foram mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 500 U/mL de penicilina G, 300 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 10% de soro bovino fetal, a 37 °C e 5% de CO₂ em garrafas de 25 cm² (TPP, Suíça) em um volume de 10 mL/frasco. A cada 3-4 dias, as linhagens foram sub-cultivadas na concentração de 5x10⁴ células/mL após tripsinização com solução de tripsina-EDTA 0,05%, quando necessário.

3.3.2. Ensaios com linhagens tumorais

As linhagens em suspensão, U-937, Daudi, Jurkat (10⁶ células/mL), e as aderentes HeLa, HRT-18 e SY5Y (10⁵ células/mL, ou numero suficiente para atingir ~80% de confluência) em crescimento exponencial foram incubadas em meio RPMI 1640 suplementado com 500 U/mL de penicilina G, 300 µg/mL de sulfato de estreptomicina e 1% de soro bovino fetal, a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ em placas estéreis de 24 ou 96 cavidades (TPP, Suíça), 24 h, tempo necessário às células se adaptarem a nova condição. Em seguida, foram expostas ao extrato e/ou frações de *L. pacari* por período adequado a cada experimento. Cada ensaio foi realizado em triplicata e, como resultado de cada experimento, usou-se a média da triplicata.

3.3.3. Isolamento de células mononucleares humanas

Amostras de sangue periférico de indivíduos voluntários sadios, onde nenhum dos doadores fazia uso de medicamento por ocasião da coleta, foram colhidas após consentimento livre e esclarecido, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR, sob Protocolo CEP/SD 039.SI.003/04-01 (Anexo B). Os sangues coletados em seringas estéreis e anticoagulados com heparina sódica foram utilizados para obtenção das diferentes populações de leucócitos humanos. Células mononucleares (MNC: linfócitos e monócitos) foram separadas dos granulócitos (GRN: neutrófilos, eosinófilos e basófilos) por meio de centrifugação usando-se Ficoll-Paque™PLUS (Amersham, Biosciences) 1,077 g/cm³ como gradiente de densidade. Após centrifugação a 400 x *g* por 10 min em TA, foi retirado o plasma rico em plaquetas, sendo o volume reconstituído com PBS. Nova centrifugação a 800 x *g* por 25 min permitiu a separação do creme leucocitário (±2 mL), que foi adicionado de PBS (±9 mL) e gentilmente depositado sobre o gradiente de densidade (3 mL). Após centrifugação (200 x *g* por 30 min em TA), os MNC recuperados da interface do gradiente foram lavados duas vezes com PBS (800 x *g*/5 min), ressuspensos em RPMI 1640 e a concentração ajustada para 10⁶ células/mL com auxílio de hemocítômetro.

3.3.3.1. Ativação de linfócitos por PHA

Células MNC (10⁶ células/mL) foram incubadas em RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 10% do Meio para Cariótipo (Cultilab-Campinas/SP), a 37 °C, por 4 dias, em atmosfera de 5% de CO₂ (Bier, 1977). Para avaliar a atividade do extrato de *L. pacari*, linfócitos ativados por PHA foram transferidos para placas de cultivo de 96 poços em meio RPMI 1640 suplementado com 1% de soro fetal bovino; concentrações crescentes 10, 100 e 1000 µg/mL do mesmo foram, então, adicionadas aos ensaios e incubados por mais 24 h. Cada ensaio foi realizado em triplicata e, como resultado de cada experimento, usou-se a média da triplicata.

3.3.4. Isolamento de células da medula óssea de camundongo

Para avaliação da atividade do extrato de *L. pacari* sobre células hematopoiéticas prematuras, a medula óssea presente no fêmur de camundongos foi isolada. Esta metodologia foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPR, sob Protocolo CEEA 23075.028831/2008-33 (Anexo C). Três camundongos na espécie Swiss do

sexo masculino foram anestesiados com éter, sacrificados por deslocamento cervical, e os fêmures obtidos. Sob esterilidade, com uma seringa, as células de medula óssea foram retiradas do fêmur, lavadas com PBS e centrifugadas. Após verificação da viabilidade celular, 5×10^4 células foram incubadas em meio RPMI 1640 suplementado com 1% de soro fetal bovino, em cada cavidade da placa estéril de 96 cavidades (TPP, Suíça), a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂ (Bier, 1977), por 36 h, com extrato de *L. pacari* nas concentrações de 10 e 1000 µg/mL.

3.3.5. Viabilidade/Toxicidade celulares

A viabilidade das linhagens celulares e das células MNC utilizadas neste estudo foi avaliada em todas as etapas dos procedimentos metodológicos usando-se o teste de exclusão com Azul de Trypan, segundo Merchant e colaboradores (1964), onde as células foram diluídas apropriadamente em solução a 0,4% do corante em PBS e sua viabilidade observada ao microscópio de luz (Olympus CH30). As células discriminadas como viáveis apresentaram-se íntegras, brilhantes, incolores e redondas, enquanto que as não viáveis mostraram-se coradas em azul, muitas com perda da definição de contorno. Em todos os experimentos, as células utilizadas apresentaram viabilidade >90%. A toxicidade do extrato de *L. pacari* sobre as linhagens U-937, Daudi e Jurkat foi avaliada após 48 h de exposição primeiramente usando o teste de exclusão com Azul de Trypan.

3.3.5.1. Determinação da lactato desidrogenase (LDH)

A determinação da LDH por método cinético, em aparelho Cobas Mira Classic (Roche), foi realizada no sobrenadante e no lisado celular provenientes de experimentos realizados com a linhagem U-937 tratada com concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL do extrato e frações de *L. pacari* por 24 h, a 37 °C, em atmosfera de 5% de CO₂, usando-se o sistema comercial LDH Liquiform (Labtest Diagnóstica S/A). Foi realizada a leitura a 340 nm do lisado celular e do sobrenadante das células, e assim calculado a viabilidade celular, de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ LDH liberado} = \frac{\text{LDH sobrenadante} \times 100}{\text{LDH total}}$$

(sobrenadante + lisado celular)

$$100 - \% \text{ LDH liberado} = \% \text{ LDH não liberado}$$

Células mortas Células vivas

3.3.6. Citocentrifugados

Para observação morfológica das linhagens celulares e dos MNC, citocentrifugados contendo 8×10^4 células foram preparados por centrifugação por 5 min em TA, sob baixa aceleração, em citocentrífuga Cytopro (Wescor). Em seguida, as lâminas secas ao ar foram coradas com o May-Grünwald-Giemsa (MGG) e as células diferenciadas e enumeradas com auxílio de um microscópio óptico.

3.3.6.1. Coloração de May-Grünwald-Giemsa

Lâminas contendo citocentrifugados secos ao ar foram recobertas completamente com corante de May-Grünwald por 3 min; posteriormente, o corante foi diluído com gotas de água destilada tamponada, pH 6.8, por 1 min. Em seguida, as lâminas foram recobertas com corante de Giemsa diluído em água tamponada (1:20) por 15 min e, finalmente, lavadas em água corrente e secas ao ar.

3.3.7. Ensaio clonogênico

Células U-937, Daudi e Jurkat (1000/ensaio) foram adicionadas a 1 mL do meio comercial apropriado para o cultivo de progenitores hematopoiéticos, distribuídas em placas de 24 cavidades (TPP, Suíça) e incubadas a 37 °C em atmosfera úmida, com 5% de CO₂, por 15 dias, com extrato de *L. pacari* nas concentrações de 1 e 10 µg/mL, onde cada ensaio foi realizado em triplicata. As colônias foram quantificadas sob microscópio ótico invertido.

3.3.8. Citometria de Fluxo

3.3.8.1. Anexina V *versus* 7-AAD

Células U-937, HeLa, HRT-18, SY5Y e MNC expostas a diferentes concentrações (10-1000 µg/mL) do extrato de *L. pacari* por 6, 12 ou 24 h em atmosfera úmida a 37 °C, com 5% de CO₂ foram lavadas com PBS gelado e ressuspensas no Tampão de ligação 1x (1×10^6 células/mL). Cem microlitros de suspensão celular foram transferidos para tubos apropriados, adicionados de 5 µL de Anexina V-FITC (BD Pharmingen, Biosciences) e 5 µL de 7-AAD (BD Pharmingen, Biosciences) e incubados por 15 min em TA, ao abrigo da luz. Em seguida, 400 µL de Tampão de ligação 1x foram adicionados e as células imediatamente

analisadas em um citômetro de fluxo FACS Calibur (Becton & Dickinson, San Diego, California, USA), equipado com laser de Argônio (488 nm). Para cada análise, 10^5 eventos foram adquiridos, e gráficos baseados na emissão de fluorescência do FITC (FL1-H) e do 7-AAD (FL3-H) foram construídos em escala logarítmica. Foram consideradas células positivas aquelas que expressaram fluorescência acima da linha limite de fluorescência, a qual foi negativa para o controle. Os resultados foram analisados com auxílio do programa WinMDI 2.8.

3.3.8.2. Ciclo celular

Para análise do ciclo celular, 10^6 células da linhagem U-937 expostas ao extrato de *L. pacari* (100 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) por 24 h em atmosfera úmida a 37 °C, com 5% de CO_2 , foram lavadas com PBS gelado e fixadas com paraformaldeído 1% por 30 min. Após lavagem com PBS, as células foram incubadas à TA com 20 μL de solução de iodeto de propídio (PI) 2 mg/mL (Sigma), 300 μL de solução contendo RNase (10 mg/mL) e Triton X-100, incubados por 15 min, ao abrigo da luz. Em seguida, as células foram analisadas em citômetro de fluxo (FACS Calibur). Para cada análise, 10^5 eventos foram adquiridos, e histogramas baseados na emissão de fluorescência do PI (FL1-H) foram construídos em escala linear. Foram determinadas as fases do ciclo celular (G0/G1, S e G2/M) de acordo com a intensidade de fluorescência emitida, característica de cada fase. Os resultados foram analisados com auxílio do programa WinMDI 2.8.

3.3.8.3. Análise de linfócitos por citometria de fluxo

Após ativação de MNC com PHA conforme item 3.3.3.1., essas células foram transferidas para tubos de ensaio apropriados e analisados por citometria de fluxo. Para cada análise, 10^5 eventos foram adquiridos em escala linear, e gráficos baseados no tamanho (FSC) e na complexidade interna (SSC) das células foram construídos. Os dados foram analisados usando o programa WinMDI 2.8.

3.4. ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS RESULTADOS

Os resultados estão apresentados como a média \pm DP. Para análise estatística dos resultados, usou-se ANOVA e o teste *post hoc* empregado foi o teste de Tukey quando

apropriado. Os cálculos foram realizados utilizando-se o programa Prisma. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

3.5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS – FORMATAÇÃO

As referências bibliográficas deste trabalho foram formatadas de acordo com o padrão da Revista Brasileira de Farmacognosia.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As plantas medicinais são os principais componentes da medicina tradicional e sua utilização para o tratamento de doenças que acometem os seres humanos é uma prática milenar e que, ainda hoje, aparece como o principal recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. De acordo com o Ministério da Saúde, a “fitoterapia é uma terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal” (Ministério da Saúde, 2006).

Atualmente, não existem dados suficientes sobre a maioria das plantas medicinais que garantam sua qualidade, eficácia e segurança. A ideia de que são seguras e isentas de efeitos adversos não é verdadeira. Ao contrário, as plantas contêm centenas de constituintes e, dentre eles, muitos podem apresentar toxicidade representativa, como no caso de drogas citotóxicas descritas que, atualmente, têm ampla aplicação na terapêutica anticâncer (Calixto, 2000).

Essas drogas exibem toxicidade celular, podendo induzir genotoxicidade, carcinogenicidade e efeitos teratogênicos em células não tumorais (Baxevanis et al., 2009) e, apesar de sua elevada eficácia sobre células malignas, alvos do tratamento, estes efeitos colaterais limitam seu uso.

Muitos pacientes com câncer fazem uso de terapias medicinais alternativas complementares. Por exemplo, em trabalho realizado por Werneke e colaboradores (2004), de um total de 318 pacientes, 51,6% fizeram uso de plantas medicinais, corroborando com o grupo de Gratus (2009), que descreve que 7 a 48% dos pacientes com câncer relatam que iniciam o uso de plantas medicinais após o diagnóstico da doença.

De acordo com dados recentes, o uso de extratos de plantas medicinais é efetivo na terapia de combate ao câncer, cuja ação está atribuída ao efeito sinérgico ou complementar de compostos presentes no extrato, uma vez que o efeito citostático observado sobre células cancerosas parece ser mais eficaz do que o efeito de seus compostos isolados e biologicamente ativos (Cassileth & Deng, 2004; Li & Vederas, 2009). Assim, a procura por drogas alternativas de baixa toxicidade, que sejam eficazes no tratamento de vários tipos de câncer, forma uma importante linha de base para investigações científicas referentes à flora brasileira.

Pesquisas etnobotânicas podem ser consideradas estratégias de sucesso para a descrição de novas moléculas bioativas derivadas de plantas. Neste contexto, o Brasil se destaca por ser o país com a maior diversidade do planeta, com mais de 55.000 espécies distribuídas nos

diferentes ecossistemas (Mata Atlântica, Floresta Amazônica, Cerrado, Caatinga, Pantanal e Pampas), com uma diversidade cultural admirável e que se reflete na utilização dos recursos naturais de diferentes formas (Albuquerque et al., 2007; Melo et al., 2007; Brandão et al., 2008).

Em um levantamento etnobotânico realizado com foco em plantas medicinais utilizadas como produtos antitumorais no Brasil, o Cerrado ficou em segundo lugar em número de espécies citadas, representando 25% das listadas em todo o país (Melo et al., 2011). Mesquita e colaboradores (2009) testaram 412 extratos provenientes de 50 plantas nativas deste bioma utilizadas na medicina tradicional por 21 famílias, dentre os quais 28 apresentaram efeito antiproliferativo significativo, inibindo em até 85% a proliferação celular de quatro linhagens tumorais. Interessante ressaltar que mesmo a *L. pacari*, uma espécie nativa do cerrado, não ter sido contemplada neste estudo, foi citada como tendo a utilização popular das suas cascas contra o câncer em estudo etnobotânico recentemente publicado (Melo et al., 2011).

Como revisado na introdução deste trabalho, muitos aspectos que influenciam o uso popular de *L. pacari* vêm sendo comprovados cientificamente, porém seus efeitos sobre linhagens tumorais de uma forma geral, ou em humanas em particular, são inexistentes, corroborando a relevância deste estudo.

Considerando que grande parte da população consome, na atenção primária à saúde e para o tratamento de diversas patologias, plantas medicinais na forma de chá, ou seja, como extrato aquoso, este trabalho procurou avaliar, sob vários aspectos, a influência do extrato preparado dessa espécie sobre o comportamento de várias linhagens tumorais humanas.

Inseridos neste conjunto, passamos a relatar os resultados obtidos ao se investigar alguns aspectos do comportamento celular após exposição aos extratos e frações de *L. pacari*, usando sistemas *in vitro* de cultivo celular; em um primeiro momento, as observações recaem sobre diferentes linhagens leucêmicas; em seguida, sobre linhagens tumorais de câncer de colo do útero, de cólon e provenientes de neuroblastoma e, finalmente, sobre células MNC humanas e de camundongos.

4.1. MATERIAL BOTÂNICO

4.1.1. Escolha do solvente extrator

Extratos brutos vegetais são misturas complexas constituídas quase sempre por diversas classes de produtos naturais, contendo diferentes grupos funcionais. O termo *extração*

significa retirar, da forma mais seletiva e completa possível, as substâncias ativas contidas na droga vegetal, utilizando, para isso, um líquido ou uma mistura de líquidos apropriados. Existem vários fatores que interferem na extração de substâncias a partir de materiais vegetais, como por exemplo, o seu grau de divisão, o solvente extrator e a forma de extração (Simões et al., 2005). Na escolha de um método extrativo, deve-se, portanto, considerar a eficiência, a estabilidade das substâncias extraídas e a disponibilidade dos meios, sem negligenciar o custo do processo escolhido.

O grau de divisão está relacionado com o modo pelo qual o solvente penetra no material para possibilitar sua difusão, o qual, por sua vez, relaciona-se com a estrutura histológica do vegetal. Se a estrutura é bem compactada, como nos caules e raízes, o solvente terá maior resistência para penetrar. Dessa forma, sua redução ou, de preferência, até a forma de pó, facilitará a operação. Quanto ao solvente extrator, deve-se escolher aquele com maior afinidade com os compostos que se pretende extrair, com o objetivo de ser o mais seletivo possível; entretanto, a seletividade depende da polaridade e é necessário o conhecimento do grau de polaridade do solvente (ou de uma mistura de solventes, muitas vezes) que mais se aproxime do ótimo de seletividade para determinada extração (Ong, 2004).

Quanto à forma de extração, existem diversas maneiras de se retirar substâncias de drogas vegetais, podendo ser realizadas à frio (maceração, percolação, turbolização, turbólise e turboextração), à quente em sistemas abertos (infusão e decocção) ou fechados (arraste por vapor d'água e em aparelho de Soxhlet), ou por micro-ondas, ultrassom, fluido supercrítico e, ainda, por micro extração em fase sólida, uma técnica descrita na década de 90 e considerada relativamente nova. Algumas desvantagens podem ser observadas nos processos de extração, como o longo tempo de exposição entre a droga vegetal e o solvente extrator, o alto custo de equipamentos e materiais ou o uso de altas temperaturas, que pode levar à formação de artefatos e/ou promover degradações inconvenientes, como a hidrólise ou racemização (Vinatoru, 2001; Ong, 2004; Sahoo et al., 2010).

Uma das técnicas mais usuais devido à simplicidade e baixo custo é a maceração da matéria prima vegetal, uma extração a frio realizada em recipiente fechado, sob agitação eventual, em TA, durante horas ou dias. Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria prima vegetal devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula vegetal. Diversas variações conhecidas desta operação objetivam o aumento da eficiência de extração, entre elas está a remaceração, a qual ocorre quando a operação é repetida utilizando o mesmo material vegetal, renovando apenas o líquido extrator (Simões et al., 2005).

Devido à utilização popular em água e com o objetivo de se extrair a maioria das substâncias polares das cascas do caule de *L. pacari*, buscou-se a utilização de solventes com alta polaridade como a própria água, o etanol (EtOH) e o metanol (MeOH), isolados ou em combinação. Assim, os resultados em termos de resíduo seco obtidos para os extratos após maceração do pó das cascas do caule de *L. pacari* por 72 h, de acordo com a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (2010), estão apresentados na Figura 4.

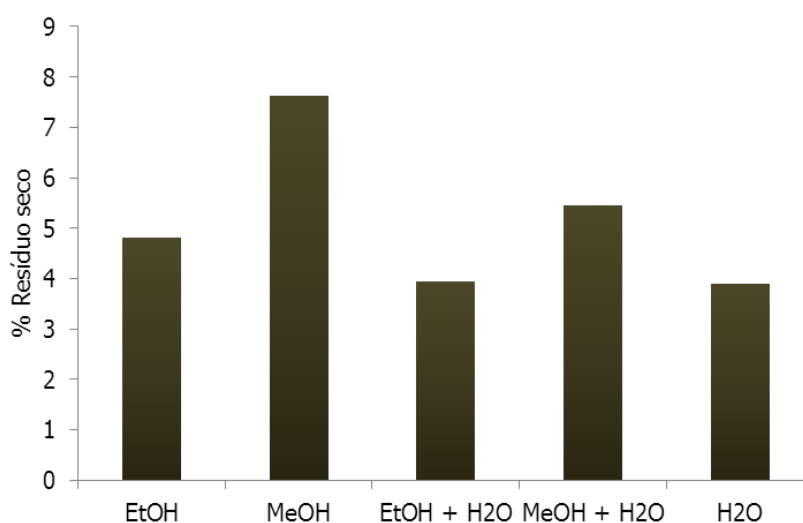


Figura 4. Rendimento de extratos de *Lafoensia pacari* obtidos com diferentes solventes polares. Cascas secas e pulverizadas de *L. pacari* (5 g) foram maceradas em água (H₂O), etanol (EtOH), metanol (MeOH), isolados ou em combinação (1:1; v/v), a frio, por 72 h. Cada barra representa o peso seco (em percentagem) obtido conforme metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira (2010).

Os valores de resíduo seco obtidos quando água, EtOH, MeOH, EtOH + H₂O (1:1; v/v), MeOH + H₂O (1:1; v/v) foram, respectivamente, 3.90, 4.83, 7.65; 3.95 e 5.46%. Tendo a extração com MeOH apresentado maior rendimento, este solvente foi, então, escolhido para a preparação do extrato de *L. pacari* usado neste estudo, doravante denominado ExtMeOH.

4.1.2. Rendimento do extrato e frações

Após a obtenção do ExtMeOH, seu fracionamento foi iniciado através da partição por solventes orgânicos de polaridade crescente com diclorometano (DCM), acetato de etila

(AcOEt) e butanol (*n*-BuOH), em funil de separação por partição líquido/líquido. Antes de iniciar a partição, o ExtMeOH foi submetido ao processo de agitação em água para a obtenção da F1, considerada fração hidrofóbica. Ao solubilizado em água foi iniciada a partição com os solventes, dos quais o DCM não extraiu quantidade possível de ser quantificada. A partir da partição com AcOEt foi obtida a fração 2 (F2), o mesmo ocorreu quando utilizado *n*-BuOH, que deu origem a fração 3 (F3), e, finalmente, a fração da partição remanescente em água (F4). Esse método de extração líquido/líquido objetivou a separação dos principais metabólitos secundários. Após a obtenção das frações, as mesmas foram dessecadas e os rendimentos calculados a partir do peso inicial da droga (300 g). Como ilustra a Tabela 1, a fração com maior rendimento foi a fração aquosa (F4). Esses resultados nos remeteram ao fato interessante no uso popular de *L. pacari*, onde suas cascas são mantidas em água.

Tabela 1. Frações do extrato metanólico de *Lafoensia pacari* e seus rendimentos.

Material	Rendimento (%)
ExtMeOH	26.50
F1	5.64
F2	0.39
F3	3.78
F4	7.96

Extrato bruto de cascas de *L. Pacari* obtido após maceração com metanol foi submetido a fracionamento com solventes de polaridade crescente, obtendo as seguintes frações: fração hidrofóbica (F1), fração ActOEt (F2), fração *n*-BuOH (F3) e fração aquosa (F4).

4.1.3. Perfil cromatográfico

4.1.3.1 Cromatografia em camada delgada

A análise de drogas vegetais por CCD permite obter um perfil das substâncias presentes (Wagner & Bladt, 1996). É um método cromatográfico do tipo adsorção e sua fase móvel é o material usado para impulsionar a amostra a ser separada sobre a fase estacionária, a

qual deve ser de um material sólido altamente polar pelo qual as moléculas de diferentes polaridades serão adsorvidas.

Com o objetivo de avaliar a composição qualitativa do ExtMeOH e das frações obtidas na partição líquido/líquido, uma CCD foi realizada sobre placa de alumínio contendo gel de sílica 60 usando-se CHCl_3 :ácido acético glacial:MeOH:acetona (2:1:1:1) como fase móvel; os resultados ilustrados na Figura 5 mostram que, após revelação com solução de ácido fosfomolibdico, uma banda de coloração azul intensa destaca-se do conjunto, tanto no ExtMeOH (Ext) quanto na F4 e, não tão intensamente, nas F1 e F3, diferente da F2, a qual, devido à polaridade não tão elevada dos solventes e à coloração característica das bandas, parece ser constituída por flavonoides.

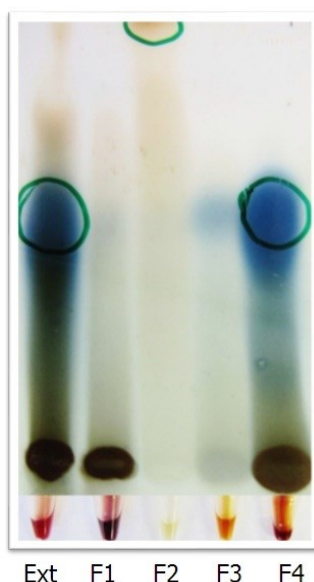


Figura 5. CCD do ExtMeOH e das frações F1, F2, F3, F4 de *Lafoensia pacari*. Cromatoplaça resultante do fracionamento do extrato metanólico de *L. pacari*, preparada sobre gel de sílica 60 com a utilização de CHCl_3 :ácido acético glacial:MeOH:acetona (2:1:1:1) como fase móvel e revelada com solução de ácido fosfomolibdico.

4.2. ENSAIOS BIOLÓGICOS *in vitro*

A cultura popular mostra que uma das condições em que *L. pacari* é utilizada relaciona-se ao tratamento do câncer, porém não há documentação científica que certifique esse uso. Assim, o objetivo maior deste trabalho foi investigar esta aplicação por meio de ensaios preliminares usando linhagens celulares humanas representantes de diferentes tipos de

câncer, as quais proliferam *in vitro* de forma regular quando mantidas em condições favoráveis.

A toxicidade de uma substância é um evento complexo que pode causar diretamente um dano celular, promover efeitos fisiológicos ou mesmo sistêmicos. Em contraste com esses dois últimos, que são mais difíceis de serem monitorados, os testes de toxicidade em nível celular podem ser mensurados por meio de ensaios experimentais que examinem as células individualmente, através da contagem do número de células que permanecem vivas e/ou funcionalmente competentes após um período de incubação pré-estabelecido.

Assim, os ensaios de viabilidade são usados para medir a proporção de células que permanecem vivas após um procedimento traumático, de natureza física, biológica ou química e, em geral, se baseiam na ruptura da integridade da membrana celular, a qual é determinada pela incorporação de um corante para o qual a célula íntegra é refratária, como o Azul de Trypan, por exemplo, o qual foi usado neste estudo.

A quantificação da toxicidade pode ser obtida não só a partir do número de células vivas recuperadas, mas também pelo número de colônias formadas por células que têm a capacidade de formar essas unidades em meios semissólidos quando apropriadamente estimuladas, denominados ensaios clonogênicos. Esse grupo de células é, geralmente, representado por células progenitoras e esses testes avaliam sua capacidade funcional regenerativa.

4.2.1. Tratamento das linhagens U-937, Daudi e Jurkat com extrato de *L. pacari*

4.2.1.1. Citotoxicidade com Azul de Trypan

Primeiramente, investigou-se a citotoxicidade do ExtMeOH sobre células leucêmicas das linhagens U-937, Daudi e Jurkat. Para tanto, células em crescimento exponencial foram expostas a concentrações crescentes de ExtMeOH (0.01 a 1000 µg/mL) e a viabilidade avaliada pelo método do Azul de Trypan, juntamente com o número de células recuperadas. Neste ensaio, cujo princípio está relacionado com a integridade da membrana celular, a viabilidade é mensurada com auxílio de microscopia, onde células discriminadas como viáveis apresentam-se íntegras, brilhantes, incolores e redondas, enquanto as não viáveis mostram-se coradas em azul, muitas com perda da definição de contorno, como descrito anteriormente (item 3.3.5). Paralelamente, citocentrifugados foram preparados desse material e corados com May-Grünwald-Giemsa (MGG) para observação da fenotipia das

células. Os resultados para as linhagens U-937, Daudi e Jurkat estão apresentados sob a forma de curvas concentração-resposta, ilustradas na Figura 6.

Primeiramente, observou-se para todas as linhagens, que a 1000 µg/mL, >99% das células recuperadas apresentavam-se intensamente coradas pelo Azul de Trypan, com indicação prévia de uma alta toxicidade do extrato de *L. pacari*. Dessa forma, os ensaios se limitaram a usar concentrações de 0.01 a 100 µg/mL.

A partir de 1 µg/mL, entretanto, foi observado, para as células U-937 (Figura 6.A) em primeiro lugar, que o extrato foi capaz de promover significativa queda na sua proliferação em relação a população não tratada ($3.46 \pm 0.23 \times 10^5$), aqui e doravante denominada população controle (CT), com somente $3.26 \pm 0.31 \times 10^5$ ($p < 0,01$), $2.95 \pm 0.38 \times 10^5$ e $1.87 \pm 0.28 \times 10^5$ ($p < 0,001$ para ambos) células recuperadas a 1, 10 e 100 µg/mL, respectivamente.

Ao se investigar mais detalhadamente essa atividade, observou-se que a 100 µg/mL, a mesma estava associada a um efeito tóxico significativo do extrato sobre as células leucêmicas, evidenciado pelo teste de exclusão com Azul de Trypan. Ou seja, nessa mesma dose, apenas $61.23 \pm 1.44\%$ ($p < 0,001$) das células U-937 permaneceram viáveis (Figura 6.A), corroborando o significativo efeito tóxico dependente da concentração previamente anunciado.

Com relação às células Daudi, perfil de toxicidade semelhante foi observado (Figura 6.B), porém mais intenso, pois já a 0.1 µg/mL observou-se redução significativa na proliferação dessas células em relação ao controle ($3.48 \pm 0.40 \times 10^5$ células), com $3.34 \pm 0.34 \times 10^5$ ($p < 0,01$), $3.36 \pm 0.20 \times 10^5$ ($p < 0,001$), $2.56 \pm 0.47 \times 10^5$ ($p < 0,001$) e $1.28 \pm 0.21 \times 10^5$ ($p < 0,001$) de células recuperadas, respectivamente, para 0.1, 1, 10 e 100 µg/mL; nesta última dose, foi observado viabilidade de somente $64.98 \pm 0.85\%$ ($p < 0,001$) das células.

Ao se investigar o efeito do extrato sobre a proliferação de células Jurkat (Figura 6.C), de modo semelhante ao relatado para as outras linhagens, ocorreu inibição da proliferação celular dependente da dose, sendo significativa a 10 e 100 µg/mL, com somente $3.02 \pm 0.41 \times 10^5$ ($p < 0,01$) e $0.74 \pm 0.28 \times 10^5$ ($p < 0,001$) células recuperadas, respectivamente, em relação ao valor de $3.90 \pm 0.37 \times 10^5$ células observado para a população controle. Interessante nesta linhagem é que somente a 10 e 100 µg/mL observou-se efeito tóxico, com somente $45.05 \pm 5.58\%$ ($p < 0,001$) das células Jurkat permanecendo viáveis a 100 µg/mL, enquanto a viabilidade média das células nas outras concentrações permaneceu >90%, muito próxima àquela encontrada para o controle.

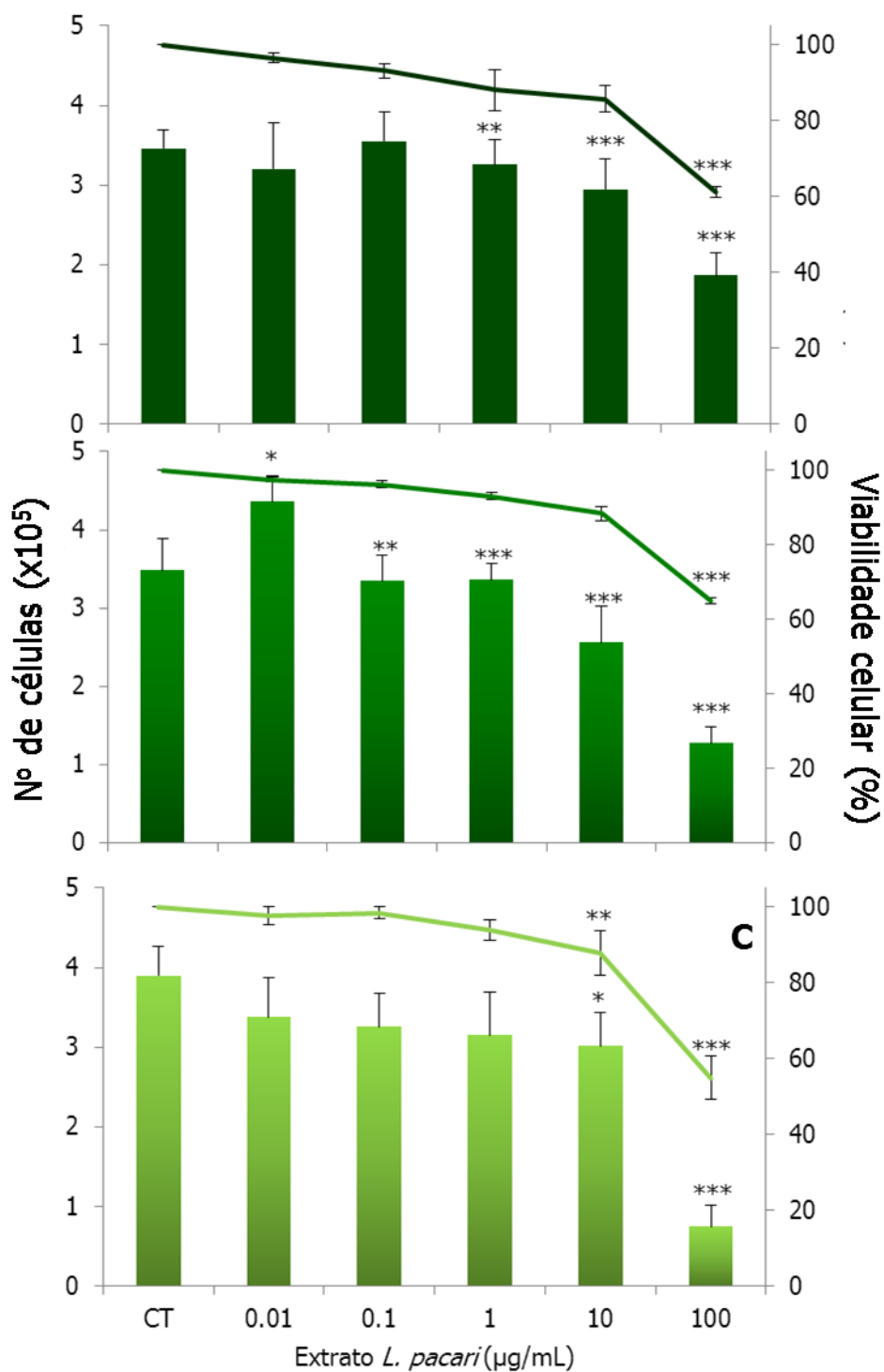


Figura 6. Efeitos do extrato de *Lafoensia pacari* sobre linhagens leucêmicas. Células das linhagens U-937 (A), Daudi (B) e Jurkat (C) foram tratadas com as concentrações indicadas do extrato de *L. pacari* por 48 h, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂ e, posteriormente, avaliadas quanto ao número e viabilidade celulares. Cada barra representa a média±DP do número de células recuperadas, enquanto as linhas representam a média±DP da viabilidade pelo método do Azul de Trypan em relação à população não tratada (CT), para a qual foi atribuído o valor de 100%, ambas obtidas de, pelo menos três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

Vários estudos semelhantes já foram realizados com o objetivo de verificar a influência de extratos de diferentes plantas medicinais sobre linhagens de células leucêmicas. O extrato de *Emblica officinalis*, Phyllanthaceae, que demonstrou ser ativo na inibição da proliferação celular das linhagens K-562 e Jurkat (Khan et al., 2002), é um exemplo, assim como o extrato etanólico de *Goldfussia psilostachys*, Acanthaceae, o qual exibiu atividade anti-proliferativa sobre células K-562 por estabilizar, semelhante às ações do paclitaxel, a dinâmica normal dos microtúbulos durante a mitose (Gao et al., 2004). Extratos preparados de *Oplopanax horridus*, Araliaceae (Tai et al., 2006) e de *Pinus densiflora*, Pinaceae, (Kwak et al., 2006) exibiram efeitos inibidores da proliferação de células HL-60 e K-562.

Da mesma forma, extratos preparados das sete variedades de *Olea europaea*, assim como o de *Scutellaria baicalensis*, Lamiaceae, demonstraram efeito anti-proliferativo sobre as linhagens HL-60 (Abaza et al., 2007) e Daudi (Kumagai et al., 2007). O extrato aquoso das raízes de *Morus alba* exibiu citotoxicidade sobre células K-562 e outras linhagens celulares cancerosas através da indução da apoptose pela inibição da montagem dos microtúbulos celulares (Nam et al., 2002).

Extratos metanólicos de três plantas medicinais brasileiras cearenses, *Jatropha elliptica*, Euphorbiaceae, *Physalis angulata*, Solanaceae, e *Tephrosia cinerea*, Fabaceae, expressaram propriedades tóxicas sobre células HL-60 (Faria et al., 2006). Outros extratos etanólicos de duas plantas brasileiras da família Apocynaceae, *Allamanda blanchetti* e *A. schottii*, exibiram efeitos citotóxico e citostático sobre células K-562 (Schmidt et al., 2006).

Popularmente conhecida como unha-de-gato, a *Uncaria tomentosa*, Rubiaceae, encontrada na Floresta Amazônica, na forma de extratos aquoso e de acetato de etila, demonstrou potente inibição da proliferação de células HL-60 por indução da apoptose (Cheng et al., 2007). Ainda, os extratos etanólico, clorofórmico e hexânico de *Varthemia iphionoides*, Compositae, demonstraram toxicidade dependente da dose sobre essas células (Al-Dabbas et al., 2006).

4.2.1.2. Citotoxicidade com LDH

Após visualização de um mesmo perfil de efeito para as três linhagens leucêmicas nos ensaios até aqui realizados, com o intuito de confirmar os resultados obtidos, optou-se por submeter somente a linhagem U-937 ao método de quantificação da lactato desidrogenase (LDH), uma enzima citosólica solúvel que têm seus níveis aumentados após a perda da integridade de membrana resultante de processos que levam a célula à morte, como a apoptose ou a necrose, por exemplo, podendo também ser liberada para o meio de cultura.

Sendo um método mais rápido, mais sensível e mais preciso, a atividade de LDH, portanto, também pode ser usada como um indicador da integridade celular, pois resulta de uma reação de acoplamento em duas etapas. Sua identificação consiste no decréscimo da absorvância em 340 nm devido à oxidação do NADH a NAD, que é proporcional à atividade da LDH na amostra, quando esta catalisa a conversão do piruvato a lactato na presença de NADH. Assim, nesta etapa do trabalho, avaliou-se não só a toxicidade do extrato de *L. pacari*, mas também a de suas frações, cujos resultados estão apresentados na Figura 7.

Como observado anteriormente, a concentração de 1000 µg/mL de extrato ou de suas frações foi significativamente tóxica para células U-937, com valores de viabilidade de somente 14.21±1.41% para o extrato, 13.64±3.81% para F1, 10.48±7.07% para F2, 22.56±13.14 para F3, e 22.52±6.64% para F4 enquanto a população controle apresentou viabilidade de 88.50±4.20%. As concentrações de 10 e 100 µg/mL do extrato apresentaram, respectivamente, 87.72±4.19 e 66.42±2.74% de viabilidade celular, sendo esta inclusive significativamente menor em relação ao controle ($p<0,001$). Quanto às frações, os valores de viabilidade foram de 84.32±6.09 e 69.53±6.20 ($p<0,01$) para F1; e de 90.42±2.49 e 78.27±3.18 para F2. Estes resultados não só confirmaram os dados anteriores, mas também mostraram a similaridade de efeitos entre o extrato e as suas frações sobre células U-937.

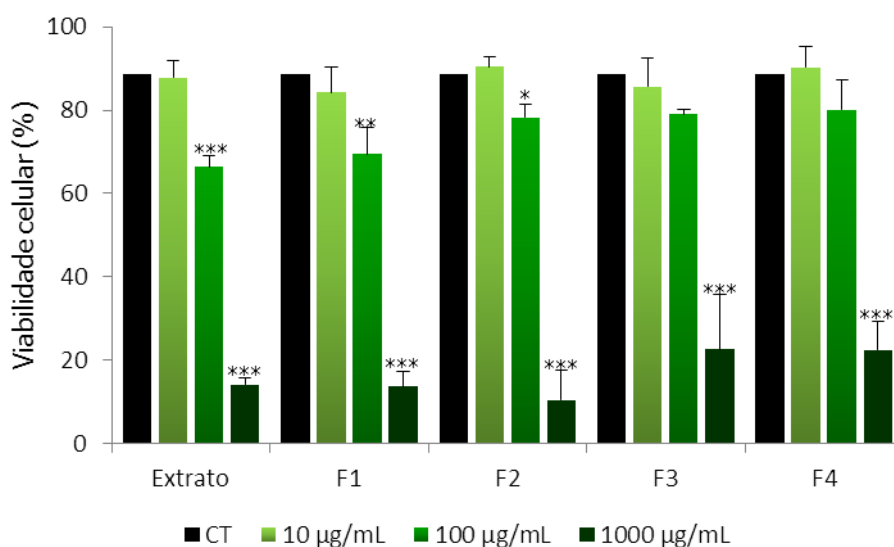


Figura 7. Efeito do extrato de *Lafoensia pacari* e frações sobre a linhagem U-937 pelo método de LDH. Células U-937 em crescimento exponencial foram tratadas com as concentrações indicadas do extrato de *L. pacari* e suas frações F1 (hidrofóbica), F2 (acetato de etila), F3 (*n*-butanol) e F4 (aquosa) por 24 h, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂; posteriormente, foi realizada a determinação da LDH por método cinético no sobrenadante e no lisado celular. Cada barra representa a média±DP da viabilidade celular, em percentagem em relação à população não tratada (CT) de, pelo menos, três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. *** $p<0,001$, ** $p<0,01$, * $p<0,05$.

4.2.1.3. Citocentrifugados

O fato de que, quando células U-937, Daudi e Jurkat foram expostas ao extrato de *L. pacari*, levou a alterações significativas tanto na sua viabilidade quanto na proliferação, levou-nos a observar os efeitos do extrato sobre a morfologia dessas células, uma vez que, conforme a maturidade, e consequente funcionalidade, a célula pode apresentar morfologia característica, devido a sua habilidade de sofrer diferenciação celular. Como essas alterações podem ser observadas em preparados citológicos convenientemente corados, citocentrifugados de células U-937, Daudi e Jurkat expostas a 1000 µg/mL do extrato de *L. pacari* após diferentes tempos de exposição (3 e 48 h), foram então preparados e corados com MGG.

Nos resultados apresentados na Figura 8, em contraste com a morfologia celular característica dessas linhagens (Figura 8, painéis 1) pode-se observar características típicas de apoptose (Figura 8, painéis 2), como a presença de vacúolos citoplasmáticos e, particularmente, com relação à condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, com formação de corpos apoptóticos, já após 3 h de exposição ao extrato de *L. pacari* indicando que o extrato estaria interferindo no metabolismo dessas células, induzindo-as ao processo de apoptose. Após 48 h de exposição, como a maioria das células já se apresentava inviável, predomínio de figuras mal definidas, com núcleo visivelmente condensado e absoluta falta de resolução citoplasmática foi o achado morfológico predominante (Figura 8, painéis 3), confirmando os resultados de viabilidade com Azul de Trypan já descritos.

Nesta série de experimentos foi possível observar que concentrações elevadas do extrato de *L. pacari* têm a habilidade de inibir a proliferação celular das linhagens leucêmicas incluídas neste estudo, independente de sua origem linfóide ou monocítica, por ser tóxico. Ou seja, o extrato para essas linhagens, além de citostático, mostrou-se tóxico em doses mais elevadas. Entretanto, em concentrações menores, essa atividade foi diferenciada entre as linhagens. Neste sentido, enquanto as linhagens U-937 e Jurkat não sofreram efeitos significativos do extrato de *L. pacari* na concentração de 0.01 µg/mL, as células Daudi mostraram-se significativamente estimuladas a proliferar, com valores de $4.26 \pm 0.33 \times 10^5$ ($p < 0,05$) em relação ao controle, de apenas 3.48 ± 10^5 células.

Um dos maiores problemas com agentes antiproliferativos é o seu efeito tóxico indiscriminado, que atinge também células saudáveis. O fato de uma substância ou extrato ser citostático, como o de *L. pacari* aqui estudado, pode ser benéfico clinicamente, no sentido de que ele inibiria a proliferação celular com concomitante diminuição de efeitos tóxicos para o paciente. Assim, como não há relatos sobre o potencial biológico deste extrato

ou mesmo de plantas do gênero *Lafoensia* sobre células cancerosas, estes resultados vêm, pela primeira vez, apontar um uso medicinal desta planta, com potencial ação farmacológica sobre células leucêmicas, a qual deve ser melhor explorada.

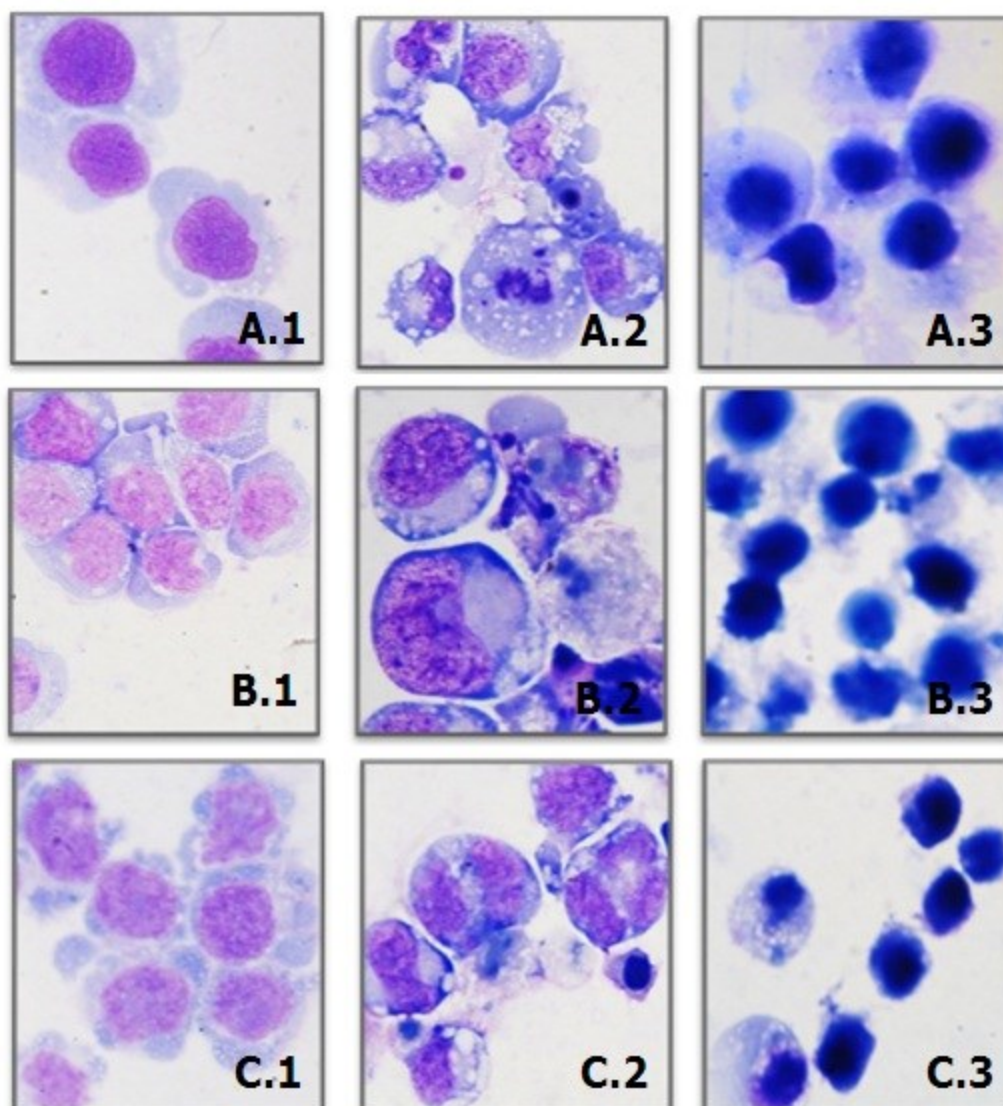


Figura 8. Influência do extrato de *Lafoensia pacari* sobre a morfologia de células de linhagens leucêmicas. Fenótipo característico (1) das células U-937 (A), Daudi (B) e Jurkat (C) em contraste com o observado após 3 (2) e 48 h (3) de exposição à 1000 µg/mL do extrato de *L. pacari*, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂ de citocentrifugados corados com May-Grünwald-Giemsa.

4.2.1.4. Ensaios clonogênicos

Se, por um lado, o fato de uma célula estar viável não é suficiente para atestar sua capacidade funcional, por outro lado, quando se avalia o potencial de um agente ou de misturas complexas, como o extrato de *L. pacari* neste trabalho, sobre linhagens celulares, é necessário estar alerta para o fato de que, muitas vezes, o efeito observado decorre sobre as células que estão proliferando, ou seja, as que estão em ciclo, perfazendo as fases G₁, S, G₂ e culminando na fase M do ciclo generativo, caracterizando a divisão celular.

Há, entretanto, sempre a existência de uma pequena população de células que não prolifera, ou seja, não entra em ciclo, permanecendo, portanto, em estado quiescente, ou fora do ciclo generativo, denominada fase G₀.

Neste contexto, quando se estuda uma população de células que tem a capacidade de exercer diferentes funções quando inseridas em um sistema metodológico apropriado, efeitos sobre a proliferação celular devem ser também investigados por meio de experimentos que as induzam a entrar em ciclo, portanto, sair do estado dormente e passar para o estado proliferativo, e que avaliem a capacidade regenerativa (ou replicativa) dessa população, como os ensaios clonogênicos.

Tendo em vista o fato de que o extrato de *L. pacari* inibiu de forma significativa, a proliferação de células leucêmicas e sabendo que essas linhagens são capazes de produzir colônias típicas em meio semissólido quando devidamente estimuladas, prosseguiu-se uma análise mais detalhada sobre a ação do extrato, mas desta vez sobre a funcionabilidade dessas células, investigando-se sua ação sobre o potencial clonogênico das linhagens U-937, Daudi e Jurkat. Assim, o efeito do extrato nas concentrações que promoveram diminuição significativa da viabilidade celular nos ensaios anteriores, ou seja, 1 e 10 µg/mL, foi avaliado através do seu cultivo em meio semissólido enriquecido com citocinas recombinantes. Após 15 dias, as colônias formadas foram visualizadas e enumeradas em microscópio invertido e os resultados estão apresentados na Figura 9.

Para as células U-937 expostas a 1 µg/mL do extrato, observou-se aumento do número de colônias formadas (124.00 ± 12.17) em relação ao controle (100.00 ± 19.97 colônias), em contraste com a concentração de 10 µg/mL, onde o número de colônias diminuiu para 72.33 ± 7.51 (n=3). O número de colônias observado para células Daudi a 1 e 10 µg/mL também diminuiu, com 86.00 ± 21.79 e 80.67 ± 6.51 colônias geradas, respectivamente, quando comparado à população controle (103.00 ± 1.00). Para a linhagem Jurkat, também se observou diminuição progressiva no número de colônias conforme a dose, com 71.33 ± 9.07 e

26.33±26.27 colônias, respectivamente, para 1 e 10 µg/mL, sendo esta significativamente menor quando comparada às 84.67±6.66 colônias obtidas no controle ($p<0,05$; $n=3$).

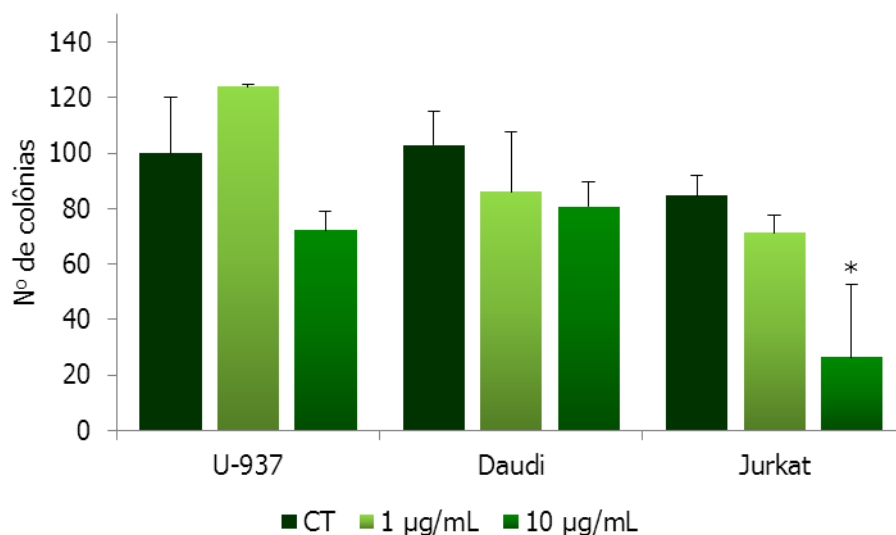


Figura 9. Efeito do extrato de *Lafoensia pacari* sobre o potencial clonogênico de linhagens leucêmicas. Células das linhagens U-937, Daudi e Jurkat foram expostas às concentrações indicadas do extrato de *L. pacari* em meio semissólido por 15 dias, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂. Cada barra representa a média±DP do número de colônias geradas de, pelo menos, três experimentos independentes, realizados em triplicata. * $p<0,05$ em relação ao controle (CT).

Nesta série de ensaios, recapitularam-se alguns dos perfis de inibição observados nos ensaios iniciais de proliferação e, mesmo com um número pequeno de experimentos, o extrato de *L. pacari* também foi capaz de inibir a formação de colônias de progenitores leucêmicos em meio semissólido, demonstrando ter influência também sobre o potencial clonogênico das linhagens leucêmicas estudadas.

4.2.2. Tratamento da linhagem U-937 com ácido elágico

Nesta etapa do trabalho, após observação dos efeitos citostático e citotóxico do extrato e frações de *L. pacari* em células leucêmicas, buscou-se observar se o ácido elágico (AE), marcador fitoquímico da espécie, poderia estar contribuindo com essas ações. Para tanto, ele foi submetido aos mesmos ensaios experimentais.

Como mostra a Figura 10, em relação à população não tratada (CT), mínimas alterações, tanto com relação ao número de células recuperadas (Figura 10.A) quando expostas a 0.1 (91.62%±9.38), 1 (92.52%±8.05), 10 (107.02%±7.36) ou 100 µg/mL (104.64%±5.40), que correspondem a 0.3, 3, 30 e 300 µM de ácido elágico, respectivamente, ou à viabilidade celular (Figura 10.B) foram observadas. Interessante notar que diferenças significativas em relação à viabilidade de células tratadas com o extrato e frações de *L. pacari* só foram observadas a 100 µg/mL ($p<0,01$), concentração na qual o AE nitidamente não apresentou efeito citotóxico (Tabela 2).

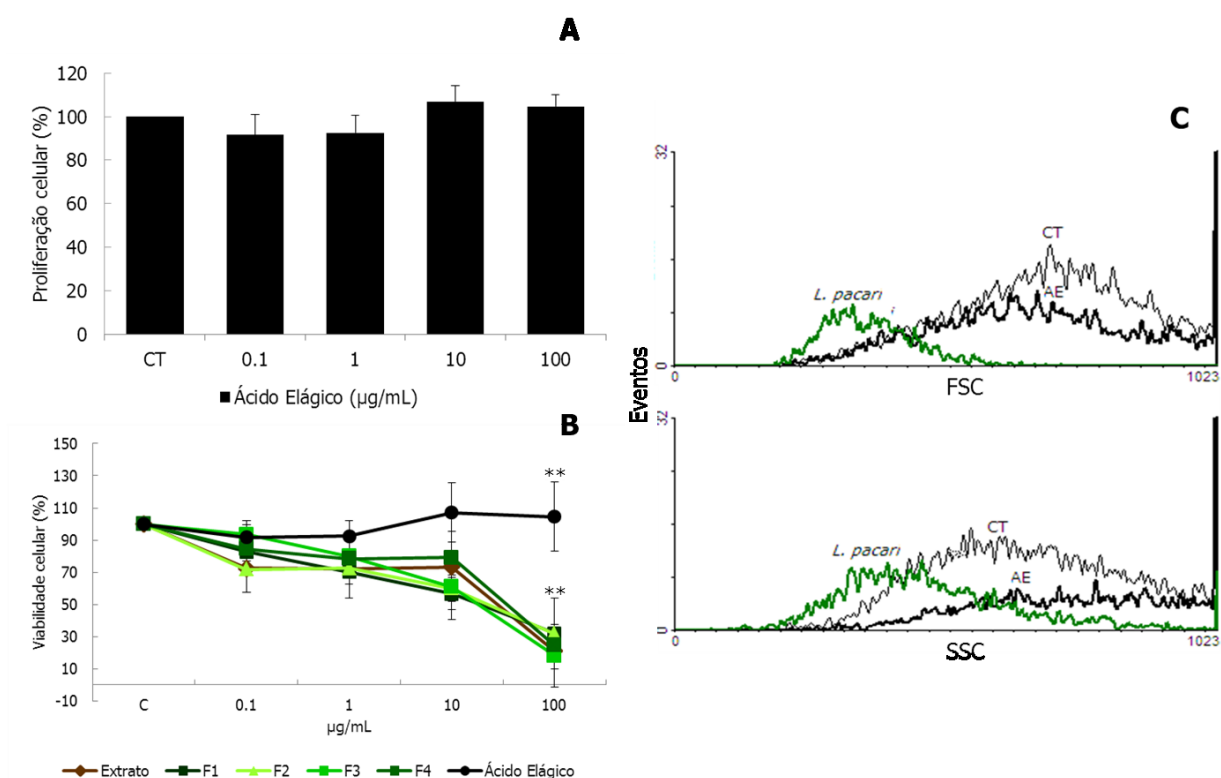


Figura 10. Efeitos do ácido elágico e do extrato e frações de *Lafoensia pacari* sobre a linhagem U-937. Células da linhagem U-937 foram tratadas com as cocentrções indicadas de ácido elágico (AE) e do extrato e frações de *L. pacari* por 24 h, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂ e, posteriormente, avaliadas quanto ao número de células e viabilidade celular. Cada barra (A) representa a média±DP do número de células recuperadas, enquanto as linhas (B) representam a média±DP da viabilidade, obtida pelo método do Azul de Trypan em relação à população não tratada (CT), para a qual foi atribuído o valor de 100%, ambas obtidas de, pelo menos 3 experimentos independentes, cada um realizado em triplicata. ** $p<0,01$. (C) A morfologia celular foi realizada por citometria de fluxo, onde comparação do perfil topográfico das células tratadas com ácido elágico e com extrato de *L. pacari*, ambos a 100 µg/mL, por 24 h, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂, foi verificado pelo tamanho da célula (FSC) versus a complexidade interna (SSC).

Tabela 2. Efeito do ácido elágico e do extrato de *Lafoensia pacari* e suas frações sobre a viabilidade celular da linhagem U-937.

Doses (µg/mL)	0.1	1	10	100
ExtMeOH	72.55±4.43	72.10±9.23	73.25±9.32	21.17±2.69
F1	82.85±14.86	70.20±3.38	56.73±10.06	32.05±2.69
F2	71.66±14.22	72.44±18.50	60.06±8.20	31.84±22.14
F3	89.27±8.70	72.56±10.78	68.08±20.03	24.89±19.40
F4	82.03±6.05	82.78±11.77	67.90±16.51	22.30±3.29
AE	92.44±8.00	84.41±9.68	94.75±18.39	79.34±21.26**

Cada valor expressa a percentagem, em relação à população não tratada (CT) e para a qual foi atribuído o valor de 100%, de células U-937 viáveis recuperadas após exposição, por 24 h, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂, às doses indicadas de ácido elágico (AE), extrato de *L. pacari* ou suas frações hidrofóbica (F1), ActOEt (F2), *n*-BuOH (F3) e aquosa (F4) avaliadas pelo método do Azul de Trypan. ** $p < 0,01$ em relação às células tratadas com AE, ExtMeOH de *L. pacari* e suas frações.

Esses resultados foram confirmados por citometria de fluxo (Figura 10.C), após observação do padrão morfológico distinto apresentado pelas células tratadas com 100 µg/mL do ExtMeOH, com nítido deslocamento dos histogramas que representam os parâmetros relacionados ao tamanho da célula (FSC) e à complexidade interna (SSC) para a esquerda do gráfico, indicando estreito relacionamento com as características apoptóticas observadas nos citocentrifugados da Figura 8.A, em contraste com a semelhança entre os histogramas das populações controle e a tratada com AE.

A ausência de efeitos tóxicos do AE sobre células U-937 corrobora o estudo já realizado por Mertens-Talcott & Percival (2005), que observaram que o AE não interferiu com a viabilidade ou com o número de células MOLT-4, também de origem leucêmica, avaliadas em condições experimentais semelhantes, usando o teste de exclusão com o Azul de Trypan e discordando do trabalho de Han e colaboradores (2006), os quais demonstraram efeito citotóxico importante do AE sobre células tumorais usando o método do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazolil]-2,5-difeniltetrazólio).

Neste contexto, é preciso estar ciente de que, para o ensaio do MTT, que inclui a redução de sais tetrazólio por enzimas succinato tetrazólio redutases situadas em mitocôndrias de células viáveis (Mosmann, 1983), interferências de substâncias que são capazes de formar produtos azuis de formazan na ausência de células já foram descritos, o que pode levar a resultados falsos positivos (Bruggisser et al., 2002) e, conseqüentemente, a interpretações equivocadas dos resultados.

Peng e colaboradores (2005), por exemplo, apresentaram estudos mostrando a capacidade que flavonoides têm em reduzir o MTT, de maneira dependente não só da concentração, mas também do tempo de reação. Considerando, por um lado, que flavonoides e ácidos fenólicos constituem as classes de polifenóis mais importantes, onde se inclui o AE, e, por outro lado, a possibilidade de se interpretar equivocadamente os resultados de efeitos citotóxicos, neste trabalho o clássico ensaio do LDH foi usado em detrimento do MTT para avaliação da citotoxicidade, pois em uma série preliminar de experimentos, notou-se clara e distinta interferência do extrato (ou de substâncias nele presentes) com os sais tetrazólio, independente da presença de células no sistema.

4.2.3. Avaliação de apoptose da linhagem U-937 tratada com extrato de *L. pacari* por citometria de fluxo

O conjunto de informações obtido com os ensaios de proliferação juntamente com as observações colhidas durante a análise dos citocentrifugados, onde muitas células apresentavam-se com características apoptóticas, particularmente com condensação da cromatina e fragmentação do núcleo, nos motivaram a investigar se o extrato não estaria interferindo no metabolismo dessas células a ponto de induzi-las a sofrer apoptose.

A ferramenta utilizada foi a citometria de fluxo, a qual permite análises múltiplas e independentes das características físicas e químicas de uma população de células, que são individualmente conduzidas em um canal de corrente fluida que intercepta o feixe de luz proveniente de um raio laser. No caso específico do equipamento utilizado, o FACS Calibur, o raio laser é provido pelo gás argônio.

As células, ao passarem pelo feixe de luz emitido, causam sua dispersão em várias direções, as quais dependem do tamanho/volume e da estrutura interna de cada célula (Macey, 1994). Dessa forma, o feixe de luz que passa pela partícula com um mínimo de desvio está relacionado ao tamanho da célula (FSC – *forward light scatter*), enquanto aquele que capta o desvio ortogonal aos eixos do fluido celular e do raio laser (SSC – *side light scatter*) relaciona-se com a complexidade interna celular, em particular a granularidade e a forma nuclear (Shapiro, 1985). Ainda, esta técnica analisa rapidamente, com maior acuracidade, um número muito superior de células. Também, moléculas fluorescentes, quando ligadas às células, podem ser excitadas e, subsequentemente, emitir luz de acordo com a natureza da molécula fluorescente (Assenmacher et al., 1995).

A luz dispersa e/ou a fluorescência emitida são, então, coletadas por diferentes sensores, os quais, por sua vez, convertem-nas em sinais elétricos, que são amplificados e transferidos

a processadores matemáticos. Estes produzem um conjunto de números que, ao serem analisados, caracterizam diferentes populações celulares (Robinson, 1993).

Os resultados emitidos por um citômetro de fluxo são, então, originados de uma combinação de sinais que refletem não só o tamanho e a complexidade interna de cada tipo celular analisado, mas também incluem suas características topográficas e de densidade óptica, além de fornecer detalhes sobre a expressão de moléculas ou estruturas quando ligadas a fluorocromos (Shapiro, 1985). Todos esses parâmetros celulares são analisados simultaneamente e convertidos em gráficos de coordenadas x e y , podendo se apresentar como histogramas, gráficos de pontos, de densidade ou mesmo de contorno (Macey, 1994). A escolha do tipo de gráfico repousa naquele que melhor representará ou traduzirá os resultados obtidos.

Para tanto, optou-se por células U-937, as quais foram expostas a 1000 µg/mL de extrato de *L. pacari* por 6, 12 e 24 h, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após incubação, as células foram marcadas com a proteína Anexina V conjugada ao FITC e com o corante 7-AAD, conforme descrito na seção de Material e Métodos, e, em seguida, analisadas por citometria de fluxo. Os resultados estão apresentados na Figura 11.

4.2.3.1. Expressão de Anexina V *versus* 7-AAD

Nos três experimentos realizados, foi possível observar diferenças interessantes entre o padrão de comportamento apresentado pelas células não tratadas (CT) e o daquelas expostas ao extrato, tanto com relação a apoptose quanto à necrose, traduzidas pela percentagem dessas células presente em cada um dos quatro quadrantes constituintes de um gráfico de pontos.

No painel A da Figura 11, que é representativo de um experimento típico, é possível perceber, nitidamente, o deslocamento das células de acordo com o tempo de exposição por meio da expressão de Anexina V e 7-AAD.

Anexina V e 7-AAD foram usados porque permitem analisar, respectivamente, fenômenos característicos ligados a apoptose e a necrose simultaneamente em uma população de interesse. Ou seja, a Anexina V tem elevada afinidade pela fosfatidilserina presente na porção interna da membrana citoplasmática de células íntegras. Considerando que a externalização da fosfatidilserina ocorre nos estágios precoces do processo de apoptose, a sua ligação específica com a Anexina V pode identificar o fenômeno da apoptose mais precocemente do que ensaios baseados em alterações nucleares, como a fragmentação do DNA, por exemplo (Koopman et al., 1994; Vermes et al., 1995). Assim, a marcação com

Anexina V-FITC precede a perda da integridade da membrana que acompanha os estágios mais precoces de morte celular, resultando em apoptose e/ou necrose.

Já o 7-AAD, sendo um corante de estrutura grande, não penetra em células íntegras; porém, se a célula permite sua entrada, irá se intercalar entre as bases guanidina e citosina do DNA, podendo assim ser utilizado como marcador de células não viáveis nos ensaios que utilizam a citometria de fluxo.

O uso simultâneo desses agentes é possível pela ausência de sobreposição espectral entre as emissões fluorescentes do 7-AAD e do FITC, neste trabalho o fluorocromo revelador da ligação com a Anexina V, pois este emite fluorescência em 513-530 nm (Vermes et al., 1995), sendo detectada no canal FL1-H do equipamento, enquanto o 7-AAD emite em 650 nm, na faixa vermelho do espectro (Cowden & Curtis, 1981; Zelenin et al., 1984; Schmid et al., 1992) sendo detectado no canal FL3-H.

Na série de gráficos de pontos ilustrados na Figura 11.A, onde cada ponto representa uma célula detectada no sistema, as populações vão migrando, progressivamente no tempo, do quadrante inferior esquerdo (representado por células viáveis que pouco expressam Anexina V ou 7-AAD), para o quadrante inferior direito (representado por células que expressam quantidade discreta de Anexina V, revelando um processo inicial de apoptose - ApI), seguindo para o quadrante superior direito (representado por uma população francamente em processo de apoptose, expressando altos níveis de Anexina V e baixa/moderada expressão de 7-AAD - Ap). Ou seja, no gráfico B da mesma figura, é significativamente distinta a quantidade de células que, não expostas ao extrato, permanecem viáveis mesmo após 24 h de cultura, em contraste com a população tratada, para a qual, no mesmo período, há um predomínio de células marcadas simultaneamente pela Anexina V e pelo 7-AAD, indicando que estão migrando de uma fase em apoptose para a de necrose, movimento que leva à morte celular.

Com esta série de experimentos, foi demonstrado que o extrato de *L. pacari* induz a linhagem leucêmica estudada ao processo de apoptose, confirmando os dados obtidos com os experimentos de proliferação e viabilidade celular anteriores.

Importante se faz ressaltar, que a proliferação celular descontrolada é característica do câncer e que células tumorais exibem mutações adquiridas nos genes que controlam diretamente seu ciclo celular (Sherr, 1996). Portanto, investigações que incluam observações referentes à influência do extrato de *L. pacari* sobre o ciclo celular destas células são pertinentes, uma vez que os resultados até aqui descritos são muito sugestivos de que este extrato possa agir como agente anti-tumoral atuando em uma ou mais etapas do ciclo

celular, como já descrito para outros extratos (Jimenez-Medina et al., 2006; Majewska et al., 2006; Kim et al., 2007; Tayarani-Najarani-Najaran et al., 2011; Li et al., 2012).

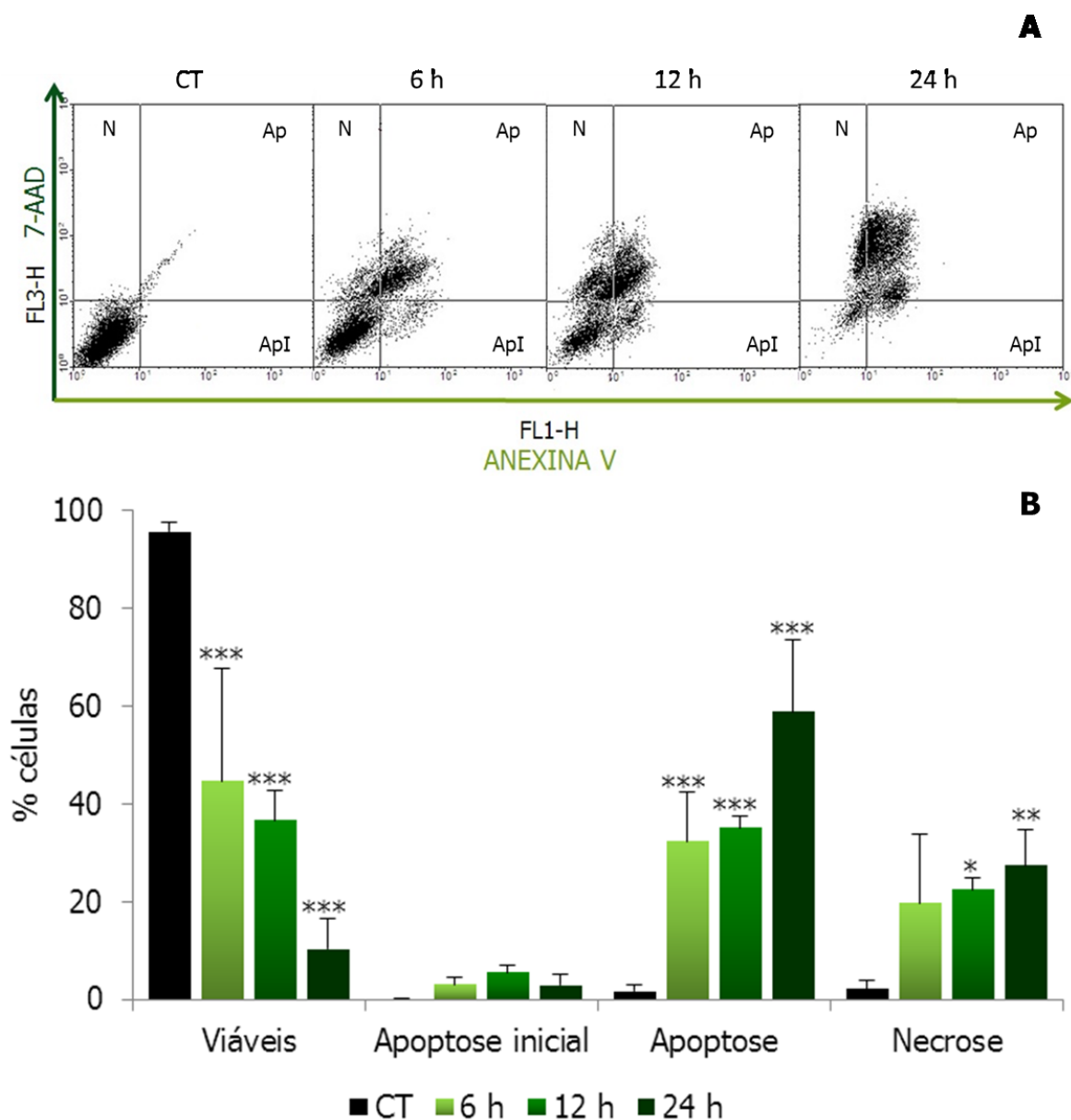


Figura 11. Efeito do tempo de exposição do extrato de *Lafoensia pacari* sobre a linhagem U-937 detectado por citometria de fluxo. Células U-937 foram expostas a 1000 µg/mL do extrato de *L. pacari* nos tempos indicados, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após incubação, as células foram marcadas com Anexina V-FITC e 7-AAD e sua expressão analisada por citometria de fluxo. **(A)** Pannel representativo de um experimento, mostrando o deslocamento celular, de acordo com o tempo de exposição, migrando do quadrante inferior esquerdo (CT), onde as células não tratadas se detêm, para o quadrante inferior direito, representado por células em processo inicial de apoptose (ApI), seguido de necrose (N, quadrante superior direito). Cada ponto representa uma célula detectada no sistema. **(B)** Cada barra representa a média±DP de células expressando Anexina V-FITC (FL1-H) e 7AAD (FL3-H), isolada ou simultaneamente, em percentagem às células não tratadas (CT). *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$.

4.2.3.2. Ciclo Celular

A disponibilidade de corantes fluorescentes que interagem com estruturas celulares de forma específica permite o uso da citometria de fluxo também para analisar eventos moleculares como, por exemplo, as fases do ciclo generativo de uma população celular. Neste contexto, o uso de fluorocromos, como o iodeto de propídio (IP), que se intercalam com as moléculas de DNA, permite a identificação da fase do ciclo celular em que as células se encontram pela determinação do seu conteúdo em DNA. Entretanto, estas análises avaliam a atividade celular, mas não determinam a proporção ou o número de células em divisão (Kubbi et al., 1985).

Após confirmação da indução de apoptose pelo extrato de *L. pacari* em células leucêmicas da linhagem U-937, utilizou-se o IP para, então, marcar o seu DNA quando tratadas com 100 e 1000 µg/mL do extrato de *L. pacari*, usando as mesmas condições em que se avaliaram os processos de apoptose, e as etapas do ciclo celular foram estudadas. Os resultados estão ilustrados na Figura 12.

O Painel A da Figura 12 mostra o perfil de ciclo celular de uma população de células U-937 resultante da exposição ao extrato por 24 h, em meio RPMI 1640 enriquecido com 1 % de soro fetal bovino, em comparação com o perfil de uma população não tratada (controle), ambos medidos em conteúdo de DNA; com as fases bem delimitadas, a maioria das células da população controle se encontra na região das fases G₀/G₁ e S do ciclo celular e, praticamente, não há presença de células marcadas na região que as antecede.

Quando se compara com os perfis apresentados pelas células que foram incubadas com 100 e 1000 µg/mL do extrato de *L. pacari*, nota-se diminuição progressiva em conteúdo de DNA nas fases G₀/G₁ e S e o aparecimento simultâneo de um pico em posição bastante anterior, o qual é característico de células em apoptose, evento já observado em outros estudos que avaliaram a indução de apoptose de substâncias de origem natural (Narayanan et al., 1999; Park et al., 2001; Ghosh et al., 2006; Giri et al., 2006; Motomura et al., 2008; Chiruvella & Raghavan, 2010; Kim et al., 2011; Yeh et al., 2011). Este pico se torna particularmente proeminente nos ensaios com 1000 µg/mL do extrato; ainda, o percentual de células detectado mostra aumento crescente e significativo de células nesta “pré-fase” de ciclo e que é diretamente proporcional à concentração do extrato (Figura 14.B).

Dentre as proteínas que rigorosamente controlam o ciclo celular, a proteína p53 exerce importante função na atividade supressora de tumores por dois mecanismos: interrupção da proliferação e indução da morte celular programada, ou apoptose. Assim, a p53 atua na proliferação celular, permitindo que sejam reparados danos espontâneos ou induzidos

durante as fases G₁-S do ciclo celular. Se houver falha dos mecanismos de reparo, os níveis de p53 aumentam e as células são, então, encaminhadas para apoptose.

Nos tumores, mutações que atingem genes que controlam a proliferação celular, em particular o gene p53, resultam na tradução de proteínas mutantes incapazes de corrigir danos genômicos e/ou levar a célula a apoptose. As células tumorais adquiriram diversas maneiras de escapar do processo de apoptose, quer por descontrole da regulação de mecanismos intracelulares ou por uma resposta imunológica ineficiente, como revisto na introdução deste trabalho. O mais importante é a evidência de que, mudando uma dessas condições, a morte celular por apoptose pode ser restabelecida (Vousden, 2002).

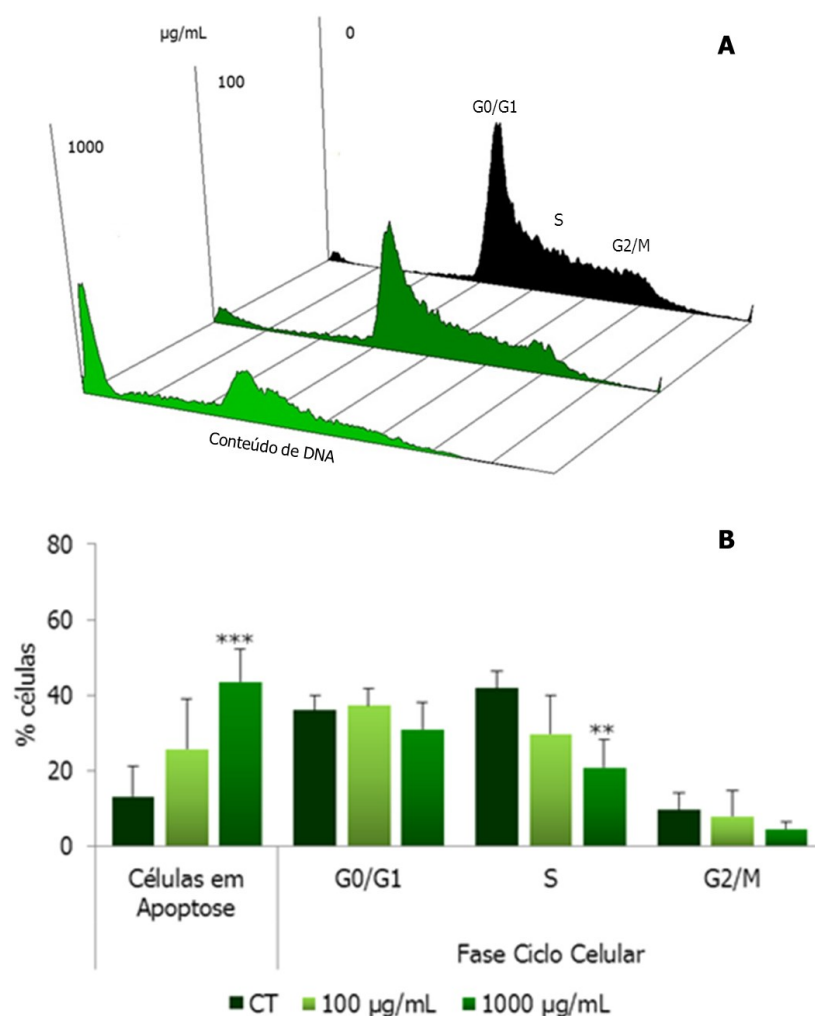


Figura 12. Efeito do extrato de *Lafoensia pacari* sobre o ciclo celular de células U-937. (A) Histogramas demonstrativos das fases do ciclo celular de células U-937 incubadas com o extrato de *L. pacari* nas concentrações indicadas, por 24 h, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂. (B) Cada barra representa a média±DP de células, em percentagem, em cada fase do ciclo celular em relação a população não tratada, obtida de três experimentos independentes. *** $p<0,001$, ** $p<0,01$.

4.2.4. Avaliação de apoptose das linhagens HeLa, HRT-18 e SY5Y tratadas com extrato de *L. pacari* por citometria de fluxo

Os ensaios realizados com as linhagens leucêmicas, cujos resultados foram demonstrados e discutidos nos itens anteriores, demonstraram que o extrato de *L. pacari* exerce (a) efeito citostático, ou seja, impede a reprodução celular; tem (b) efeito citotóxico, pois diminui significativamente a viabilidade celular e, em adição, (c) induz o processo de apoptose, pelo menos em células U-937, evidenciado não só pela co-expressão de Anexina V e 7-AAD, mas também por estudos do ciclo celular.

Para verificar se esta indução também ocorreria em outras células tumorais, foram utilizadas as linhagens HeLa, HRT-18 e SY5Y, representativas de câncer do colo de útero, do cólon e de neuroblastoma, respectivamente, na metodologia clássica que utiliza a Anexina V e o 7-AAD como indicadores de morte celular programada e necrose, cujos resultados estão sequencialmente apresentados nas Figuras 13, 14 e 15. Para células HeLa, o mesmo efeito do extrato de *L. pacari*, de forma dependente da concentração (Figura 13), ocorreu, onde o perfil obtido também foi sugestivo de uma indução dessas células a apoptose. Um fato interessante e que chamou muito a atenção durante esses experimentos foi a presença de uma autofluorescência exibida pelas células HeLa no grupo controle, onde as mesmas não foram expostas ao extrato, semelhante ao evento relatado por Ling e colaboradores (2008), que o descreveram como uma característica intrínseca dessa linhagem. Para excluir a influência deste fato nos resultados, essa autofluorescência foi “descontada” quando no delineamento dos quadrantes que precedem a análise da expressão da fluorescência emitida pela Anexina V e pelo 7-AAD.

Recentemente, Booth e colaboradores (2012), bem como Manosroi e colegas (2012) demonstraram atividades citotóxica e anti-proliferativa de plantas medicinais em células HeLa. Nesta mesma linhagem, foi descrita uma interação sinérgica citotóxica entre as saponinas digitonina, aescina, ácido glicirrízico e saponina da *Quillaja*, e monoterpenos α -pineno, timol e mentol (HerrMann & Wink, 2011). Ainda, a substância HY52 isolada das folhas da planta *Bauhinia forficata*, conhecida popularmente como pata-de-vaca, exibiu efeito antiproliferativo sobre essa mesma linhagem, cujo mecanismo refere-se à manutenção dessas células na fase G1 do ciclo celular (Lim et al., 2006).

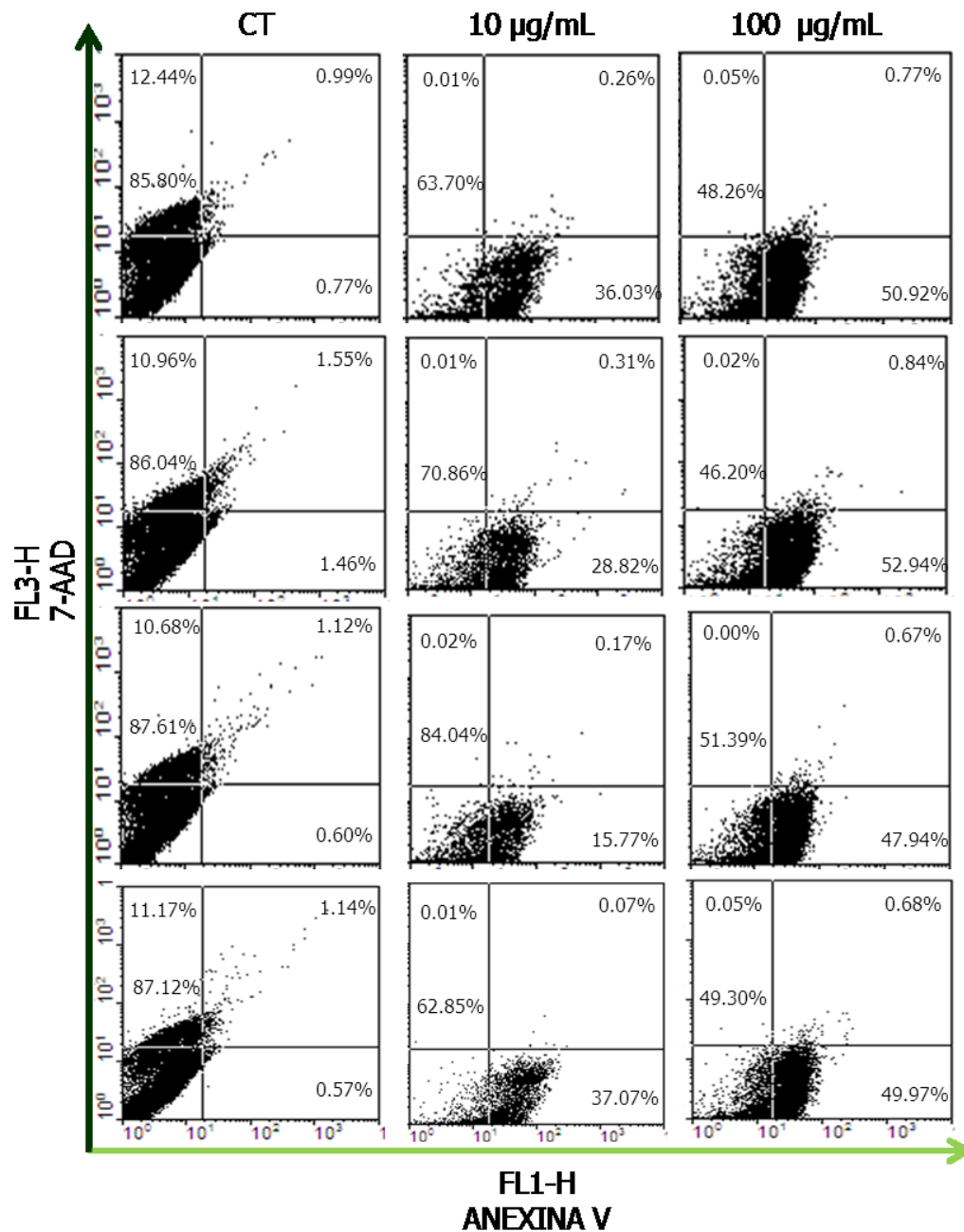


Figura 13. Efeitos da concentração do extrato de *Lafoensia pacari* sobre a linhagem HeLa. Células HeLa foram expostas por 24 h às concentrações do extrato de *L. pacari* a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após incubação, as células foram marcadas com Anexina V-FITC e 7-AAD e sua expressão analisada por citometria de fluxo. Cada painel, representativo de um experimento de quatro realizados independentemente, mostra o deslocamento celular, de acordo com a dose, migrando do quadrante inferior esquerdo (CT), onde as células não tratadas se detêm, para o quadrante inferior direito, representado por células em processo inicial de apoptose, enquanto os valores referem-se à percentagem de células detectada em cada quadrante. Cada ponto representa uma célula detectada no sistema.

Efeito semelhante ocorreu com o extrato de *L. pacari* sobre a linhagem HRT-18, conforme demonstrado na Figura 14, com dados obtidos a partir de quatro experimentos independentes realizados. Nesta linhagem, as células tumorais apresentaram maior sensibilidade ao efeito tóxico do extrato, podendo ser observado uma porcentagem significativa de células em apoptose.

Yaffe e colaboradores (2013) investigaram o efeito da piperina no crescimento de células HRT-18, onde, pelo ensaio do MTT, este alcaloide inibiu a viabilidade das células tumorais de modo dependente da dose e do tempo, sugerindo efeitos citostático e citotóxico. No mesmo estudo, usando Anexina V e IP, as células de câncer de cólon foram analisadas por citometria de fluxo, onde foi observada a inibição do ciclo celular e a indução de apoptose pela piperina.

Quanto à linhagem de neuroblastoma, a indução de apoptose foi observada para um maior número de células na concentração de 10 µg/mL do extrato (Figura 15). De modo semelhante, a linhagem SY5Y já se mostrou sensível aos efeitos citotóxicos da curcumina e do resveratrol (Lantto et al., 2009).

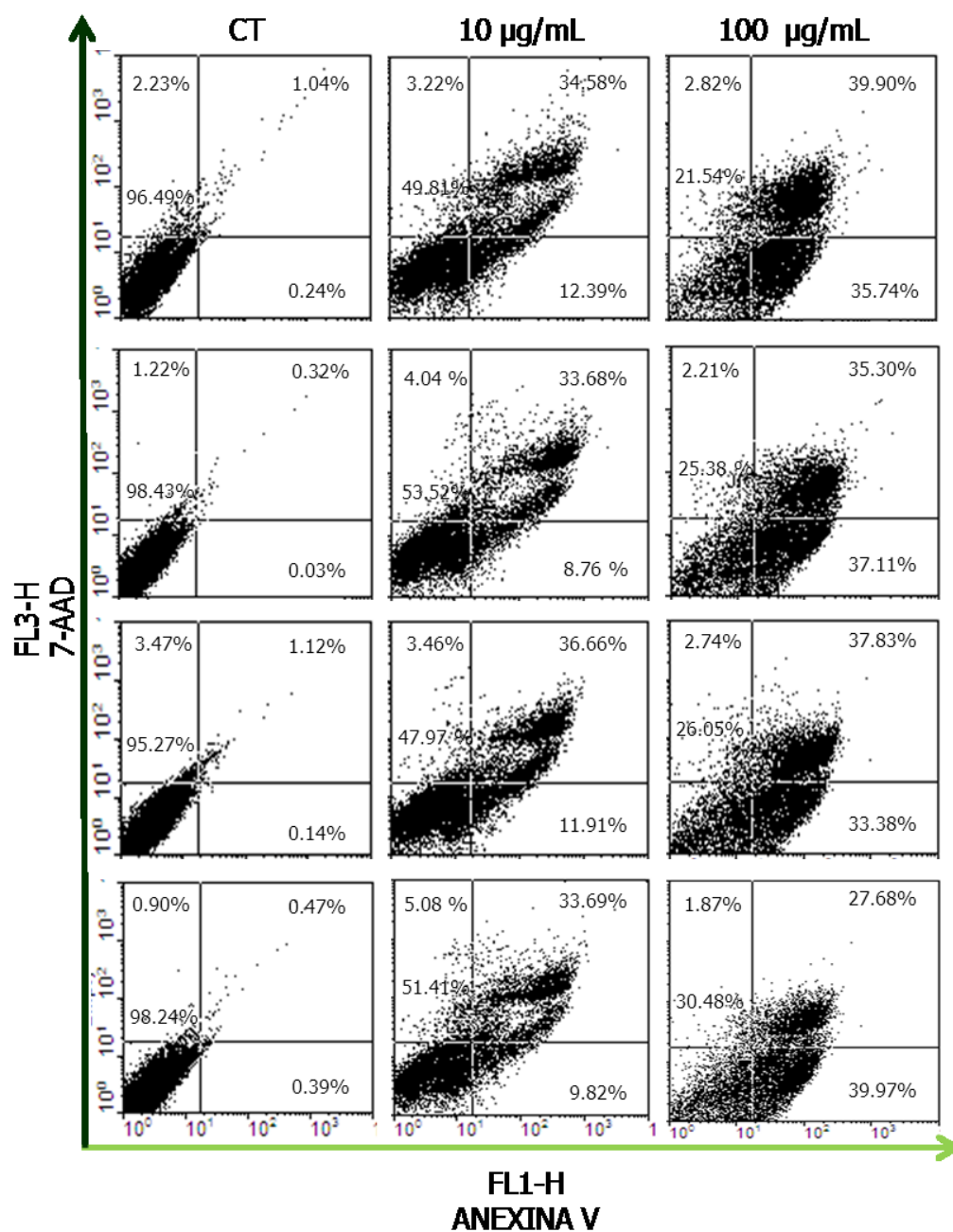


Figura 14. Efeitos da concentração do extrato de *Lafoensia pacari* sobre a linhagem HRT-18. Células HRT-18 foram expostas por 24 h às concentrações do extrato de *L. pacari* a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após incubação, as células foram marcadas com Anexina V-FITC e 7-AAD e sua expressão analisada por citometria de fluxo. Cada painel, representativo de um experimento de quatro realizados independentemente, mostra o deslocamento celular, de acordo com a dose, migrando do quadrante inferior esquerdo (CT), onde as células não tratadas se detêm, para o quadrante inferior direito, representado por células em processo inicial de apoptose, seguido de apoptose estabelecida (quadrante superior direito), enquanto os valores referem-se a percentagem de células detectada em cada quadrante. Cada ponto representa uma célula detectada no sistema.

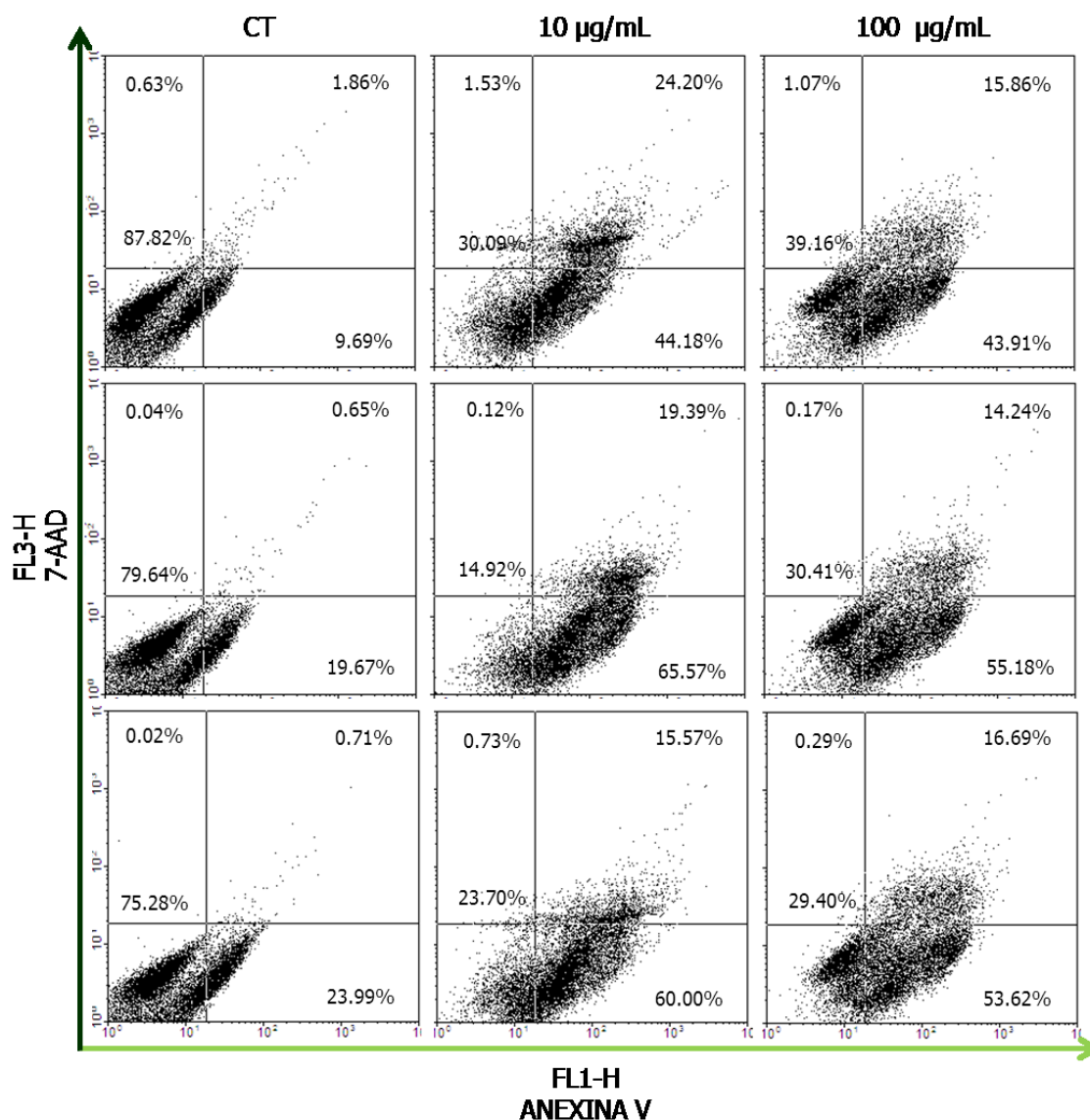


Figura 15. Efeitos da concentração do extrato de *Lafoensia pacari* sobre a linhagem SY5Y. Células SY5Y foram expostas por 24 h às concentrações do extrato de *L. pacari* a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após incubação, as células foram marcadas com Anexina V-FITC e 7-AAD e sua expressão analisada por citometria de fluxo. Cada painel, representativo de um experimento de quatro realizados independentemente, mostra o deslocamento celular, de acordo com a dose, migrando do quadrante inferior esquerdo (CT), onde as células não tratadas se detêm, para o quadrante inferior direito, representado por células em processo inicial de apoptose, seguido de apoptose estabelecida (quadrante superior direito), enquanto os valores referem-se à percentagem de células detectada em cada quadrante. Cada ponto representa uma célula detectada no sistema.

4.2.5. Células de medula óssea de camundongos tratadas com extrato de *L. pacari*

A procura por novos medicamentos naturais que possam, de forma seletiva, combater as patologias que afetam o sistema hematopoiético, particularmente aqueles relacionados às neoplasias, é frequente. Entretanto, o tecido hematopoiético é alvo constante de numerosos xenobióticos. Hematotoxicidade pode ser devida ao aumento ou a diminuição periférica de células sanguíneas de uma ou mais linhagens, com o risco de um evento clínico adverso. A hematotoxicologia *in vitro* tem, sob condições controladas, o objetivo de predizer os efeitos de substâncias em estudo, que podem limitar sua utilização clínica (Parchment, 1998).

A mielotoxicidade é um dos fatores limitantes para o uso das doses requeridas de medicamentos no tratamento de tumores, pois substâncias como os anti-neoplásicos destroem rapidamente os progenitores da medula óssea que estão em ciclo (Malerba et al., 2002). Durante o desenvolvimento de uma nova droga ou agente terapêutico, um aspecto importante é, portanto, predizer se o agente em questão pode ser tóxico para as células da medula óssea e se, se presente, se a toxicidade teria especificidade para uma ou mais de suas linhagens celulares.

Com o objetivo de avaliar se a toxicidade apresentada para células leucêmicas e tumorais se repetiria em células imaturas normais de medula óssea, ou seja, aquelas que estão em contínuo estado proliferativo, foram utilizados camundongos, dos quais essas células foram obtidas do osso fêmur; após seleção com gradiente de densidade, as células mononucleares (MNC) foram, então, cultivadas conforme metodologia descrita na seção Material e Métodos deste trabalho, e expostas ao extrato de *L. pacari*. Após o tempo de incubação, para verificar a viabilidade celular, bem como o número de células para estimar os efeitos sobre a proliferação celular, foi realizado o teste com Azul de Trypan.

4.2.5.1. Citotoxicidade por Azul de Trypan

Os resultados mostraram que, em contraste com os até agora descritos para as linhagens tumorais, o extrato de *L. pacari* pouco interferiu na viabilidade ou influenciou na proliferação das células MNC de medula óssea de camundongos (Figura 16), cujos valores de 90.10 ± 14.62 e $122.40 \pm 19.19\%$ foram registrados para tratamentos com 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$ com relação a viabilidade celular, respectivamente, com 88.95 ± 14.36 e $99.26 \pm 4.56\%$ de células recuperadas quando comparadas ao controle, para o qual se atribuiu 100% em ambos os parâmetros.

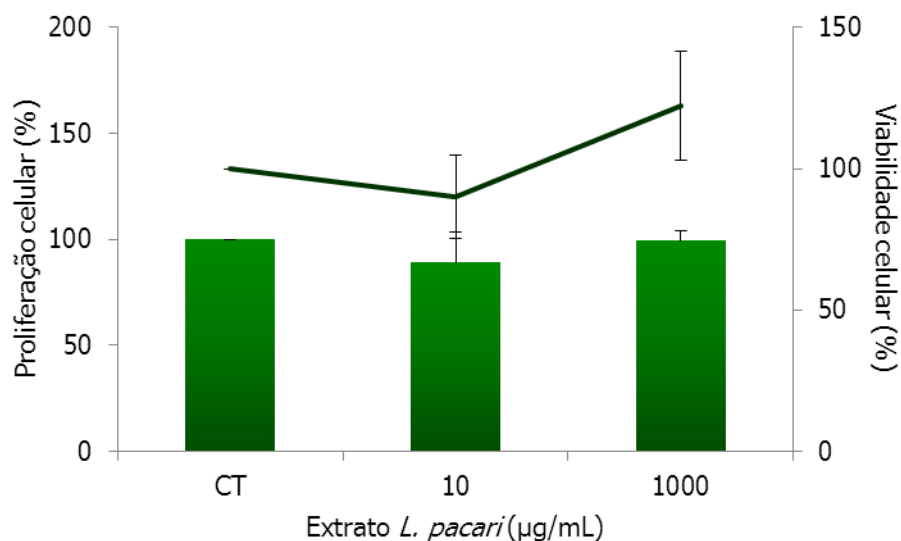


Figura 16. Efeito do extrato de *Lafoensia pacari* sobre células mononucleares da medula óssea de camundongos. Células mononucleares de medula óssea obtidas de camundongos foram tratadas com as concentrações indicadas do extrato de *L. pacari* por 36 h, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂. Cada barra representa a média±DP de células recuperadas, enquanto a linha representa a média da viabilidade celular±DP, ambas em percentagem e em relação à população não tratada (CT), para a qual foi atribuído o valor 100%, obtidas de, pelo menos, três experimentos independentes, cada um realizado em triplicata.

Esses resultados foram, além de surpreendentes, encorajadores e nos levaram a novamente questionar se os efeitos indutores de apoptose anteriormente descritos para células tumorais poderiam estar presentes em alguma fração dessas células normais. Para responder esta questão, células MNC de sangue periférico de doadores saudáveis, enriquecidas de linfócitos, foram usadas como modelo, sendo então expostas ao extrato de *L. pacari* (10 e 100 µg/mL); após o período de incubação, essas células foram, então, marcadas com Anexina V e 7-AAD e avaliadas por citometria de fluxo.

4.2.6. Células MNC de sangue periférico tratadas com extrato de *L. pacari*

O extrato de *L. pacari*, à semelhança de agentes citotóxicos utilizados na terapêutica antineoplásica corrente, não mostrou seletividade para células tumorais, induzindo as células MNC de sangue periférico em estado basal a apoptose, também de forma dependente da concentração (Figura 17).

Como a maioria das células MNC do sangue periférico se constituem de linfócitos T, sabe-se que essas células não estão proliferando, diferentemente das células leucêmicas, as quais têm como característica marcante o seu contínuo *turnover*.

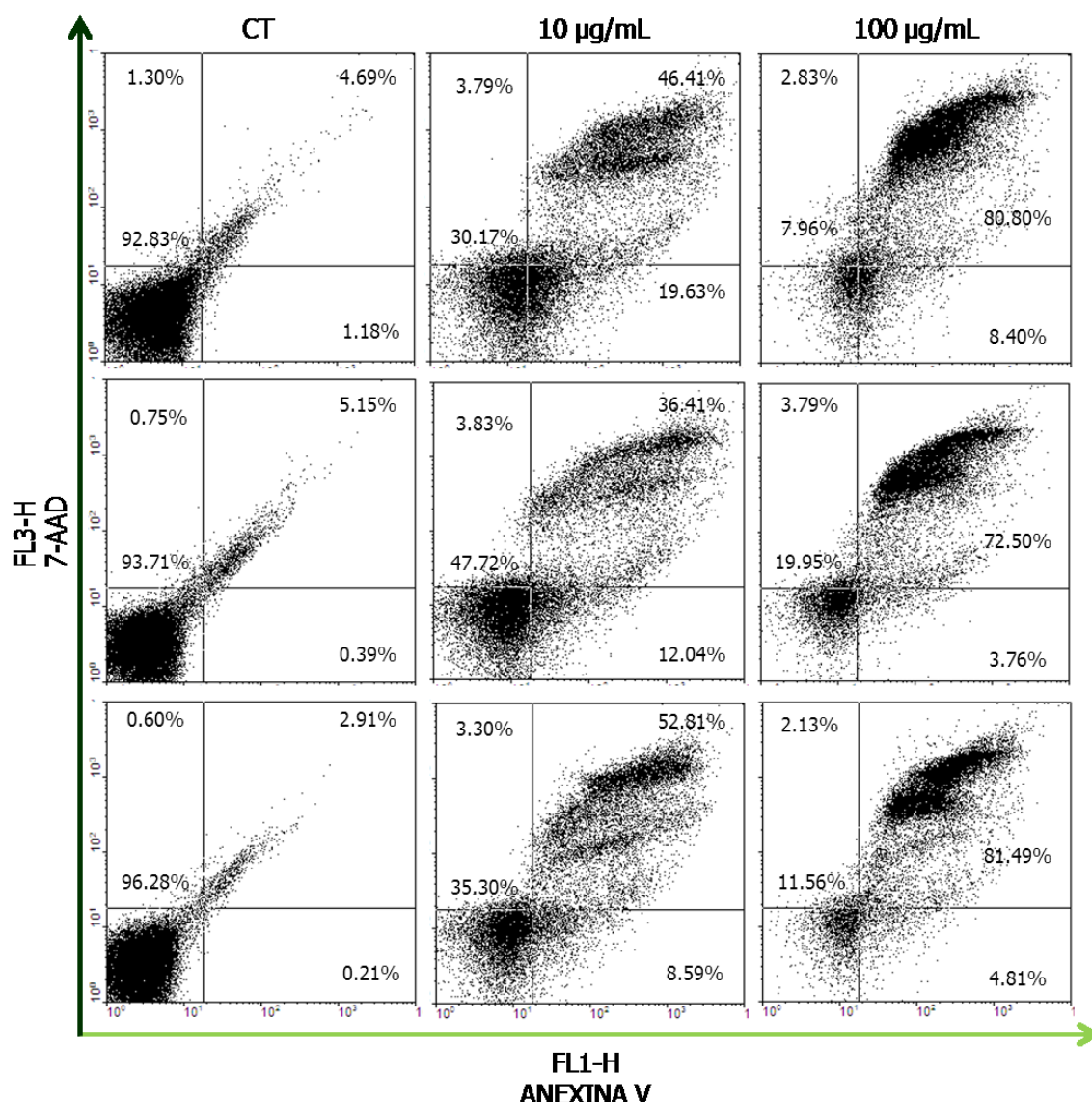


Figura 17. Efeitos da concentração do extrato de *Lafoensia pacari* sobre células MNC humanas obtidas de sangue periférico. Células mononucleares obtidas de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram expostas por às concentrações indicadas do extrato de *L. pacari* a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂. Após 24 h de incubação, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂, as células foram marcadas com Anexina V-FITC e 7-AAD e sua expressão analisada por citometria de fluxo. Cada painel, representativo de um experimento de três realizados independentemente, mostra o deslocamento celular, de acordo com a dose, migrando do quadrante inferior esquerdo (CT), onde as células não tratadas se detêm, para o quadrante inferior direito, representado por células em processo inicial de apoptose, seguido de apoptose (quadrante superior direito), enquanto os valores referem-se à percentagem de células detectada em cada quadrante. Cada ponto representa uma célula detectada no sistema.

Com o objetivo de aproximar à condição proliferativa das células leucêmicas, em uma segunda série de ensaios, as células MNC do sangue periférico foram, primeiro, cultivadas na presença de fitohemaglutinina (PHA), uma lectina dotada da capacidade de promover *in vitro* a transformação morfológica de linfócitos e estimular sua proliferação (Nowell, 1960).

Neste contexto, a maioria das células MNC periféricas estimuladas por PHA (MNC+PHA) passou a apresentar características morfológicas de células blásticas, certificadas por meio da observação microscópica das células presentes nos citocentrifugados corados com MGG e por citometria de fluxo, ou seja, mesma morfologia de células imaturas, como as encontradas nas leucemias (Figura 18).

Como ilustrado na Figura 18.A, um dos meios de se ter certeza que linfócitos periféricos estão ativados é pela alteração de sua morfologia, observada sob microscopia de imersão, em preparações fixadas e coradas por corantes hematológicos universais. Linfócitos em estado basal se caracterizam como células pequenas e arredondadas (Figura 18.X.2), com cerca de 10 μm de diâmetro, elevada relação núcleo-citoplasmática; seu citoplasma é geralmente escasso, de coloração azul em, sem a presença de granulação específica; seu núcleo também é arredondado, denso, com cromatina apresentando-se com agregados irregulares e a presença de estruturas semelhantes a nucléolos é eventual, porém mal definidos quando presentes (Lee et al., 1999). Em um citômetro de fluxo, esta população ocupa uma posição característica, de baixos FSC (x) e SSC (y), ou seja, ocupam o canto esquerdo inferior de um eixo de coordenadas (Figura 18.X.1).

Já linfócitos ativados ou transformados, aqui no caso pela ação da PHA, apresentam-se com morfologia característica de células imaturas (Figura 18.Y.2), primitivas ou blásticas (linfoblastos), sendo maiores do que linfócitos em estado basal, com cerca de 10 a 20 μm de diâmetro, citoplasma azul escuro intenso, geralmente vacuolizado, com Complexo de Golgi desenvolvido, definido como a área não corada ao redor do núcleo; apresentam-se com cromatina delicada, presença de dois ou mais nucléolos proeminentes e bem delineados; formam vesículas lisossomais características (Biberfeld, 1971). No citômetro de fluxo, esta população ocupa uma área de baixos FSC e SSC, porém mais elevados quando comparados à população não ativada (Figura 18.Y.1).

Ao avaliar-se a morfologia dos MNC obtidos de sangue periférico em citocentrifugados corados com MGG preparados após incubação de 5 dias, observou-se que, em média, somente $3,67 \pm 3,06\%$ das células tinham morfologia característica de linfoblastos nas culturas onde PHA não foi adicionada, sendo o restante constituído por linfócitos. Em contraste, linfoblastos constituíram $85,00 \pm 3,61\%$ ($n=3$) das populações estimuladas com PHA (Figura 18.B).

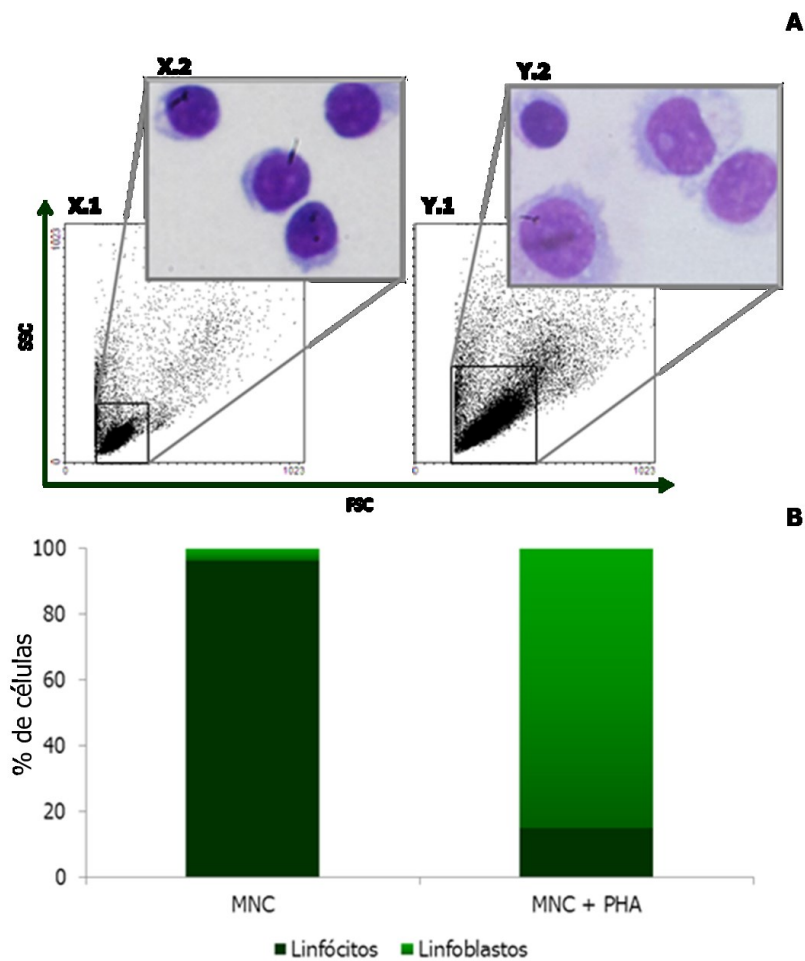


Figura 18. Efeito *in vitro* de fitohemaglutinina sobre células MNC humanas. (A) Células mononucleares humanas foram obtidas de sangue periférico de voluntários saudáveis e, após isolamento com gradiente de densidade, foram incubadas a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂, em meio RPMI 1640 contendo 10% de soro fetal bovino (MNC). Em alguns experimentos, meio condicionado contendo fitohemaglutinina (PHA) foi adicionado (MNC+PHA). Após 120 h, as células foram analisadas por citometria de fluxo (1) e citocentrifugados preparados, corados com May-Grünwald-Giemsa e observados sob imersão em microscópio comum (x1000) (2). Linfócitos (X) e linfoblastos (Y) foram distintos entre si pela morfologia característica. (B) Cada barra representa a média, em percentagem, de linfócitos e linfoblastos presentes nessas culturas, obtida de três experimentos independentes.

Quando a população de MNC periféricos estimulados por PHA foi exposta ao extrato de *L. pacari* e analisados por citometria de fluxo, observou-se que essas células apresentaram sensibilidade significativamente maior (Figura 19) ao efeito indutor de apoptose quando comparadas às em estado basal (Figura 17), com um número elevado de células aparecendo no quadrante superior direito. Ainda, este efeito foi dependente da concentração usada.

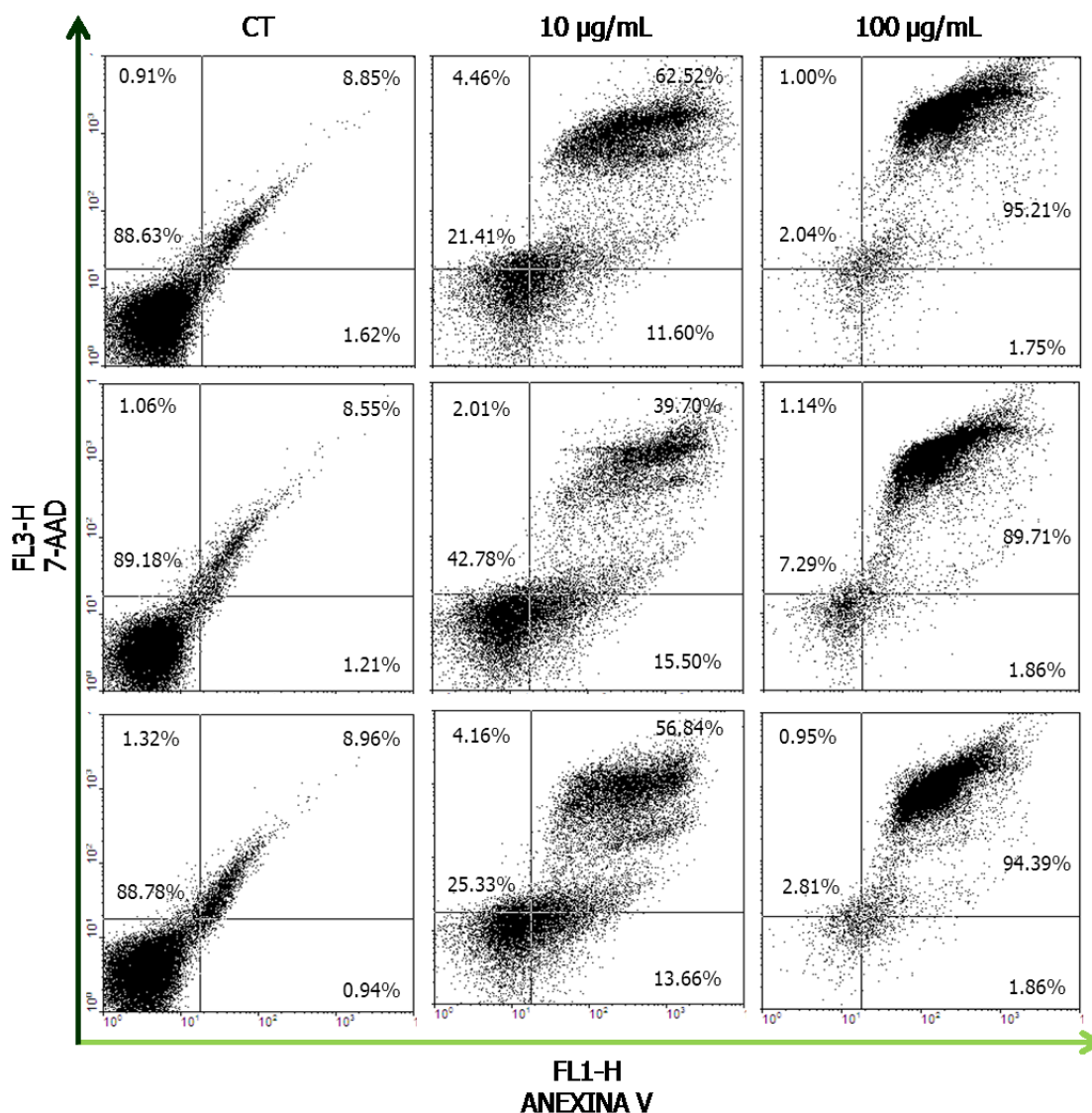


Figura 19. Efeitos da concentração do extrato de *Lafoensia pacari* sobre células MNC humanas estimuladas por fitohemaglutinina. Células mononucleares obtidas de sangue periférico de indivíduos saudáveis foram estimuladas por 120 horas a entrarem em ciclo pela presença de fitohemaglutinina, como detalhado em Material e Métodos. Em seguida, foram expostas às concentrações indicadas do extrato de *L. pacari*, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5 % de CO₂. Após 24 h de incubação, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂, as células foram marcadas com Anexina V-FITC e 7-AAD e sua expressão analisada por citometria de fluxo. Cada painel, representativo de um experimento de três realizados independentemente, mostra o deslocamento celular, de acordo com a dose, migrando do quadrante inferior esquerdo, onde as células não tratadas se detêm, para o quadrante inferior direito, representado por células em processo inicial de apoptose, seguido de apoptose (quadrante superior direito), enquanto os valores referem-se à percentagem de células detectada em cada quadrante. Cada ponto representa uma célula detectada no sistema.

Todo o conjunto de resultados até aqui relatado está apresentado resumidamente na Figura 20, onde se observa que todas as linhagens tumorais incluídas neste estudo, assim como as células MNC, independentes da presença de PHA, têm >90% de sua população composta por células viáveis e saudáveis quando mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 1% de soro fetal bovino por 24 h, demonstrada pela alta percentagem de células que não se ligam a Anexina V ou ao 7-AAD.

Mas, na presença do extrato de *L. pacari*, a quantidade de células que passaram a se ligar a Anexina V, característica de células em processo inicial de apoptose, aumenta significativamente e de maneira proporcional à concentração. O aumento da expressão de Anexina V torna-se ainda mais intenso a 100 µg/mL, quando morte celular (apoptose) é evidente pela co-expressão com 7-AAD.

De acordo com os dados obtidos, das linhagens tumorais, a HeLa foi a que se mostrou menos sensível aos efeitos tóxicos do extrato, seguida pela linhagem HRT-18 e, finalmente, pela SY5Y. Interessante notar que a característica comum de todas essas linhagens é a aderência à base do frasco de cultura enquanto proliferam, e os ensaios foram realizados somente quando os frascos das mesmas apresentavam-se com cerca de 80% de confluência e a concentração de soro fetal bovino diminuída para 1 %. Nessas circunstâncias, as células não só diminuem seu metabolismo, mas também há declínio do padrão proliferativo.

Em contraste, as linhagens leucêmicas e as MNC são mantidas nas mesmas condições experimentais, mas se mantêm em suspensão. Essas, por sua vez, foram bem mais sensíveis à ação do extrato, particularmente a população de MNC estimulada por PHA, sugerindo que o efeito indutor de apoptose parece repousar sobre células que estão em atividade metabólica intensa e/ou que estejam em ciclo celular.

Neste contexto, é de relevância lembrar que os diferentes tipos de câncer e, em particular, as leucemias, assim como os demais distúrbios neoplásicos do tecido hematopoiético, têm como componente proeminente a proliferação descontrolada e contínua das células do clone maligno, em contraste com as de clones normais, que param de proliferar, acumulando-se por causa do retardo na apoptose. Ainda, as leucemias se constituem em um exemplo de ruptura do desenvolvimento normal celular, pois se originam de uma somatória de mutações que afetam as células tronco hematopoiéticas, elementos centrais do sistema formador de sangue, comprometendo sua função e a dos seus descendentes (Franks & Teich, 1998), como revisado anteriormente, mas não no seu estado proliferativo.

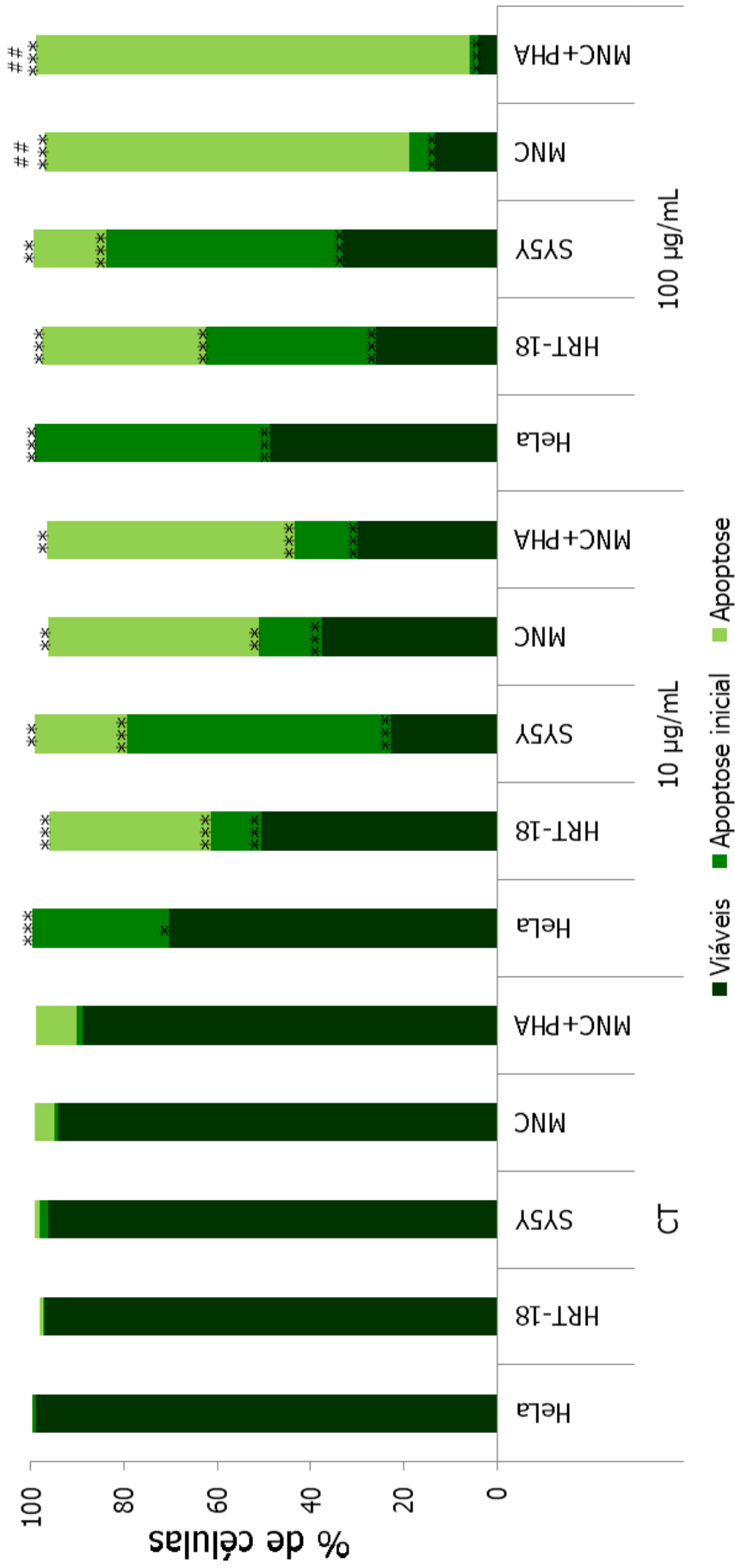


Figura 20. Efeitos do extrato de *Lafoensia pacari* sobre diferentes linhagens tumorais e células MNC de sangue periférico humano. Células das linhagens HeLa, HRT-18 e SY5Y e mononucleares (MNC) obtidos de sangue periférico humano foram expostas às concentrações indicadas do extrato de *L. pacari* por 24 horas, a 37 °C, em atmosfera úmida e 5% de CO₂. Em seguida, foram marcadas com Anexina V e 7-AAD e suas expressões detectadas por citometria de fluxo. Cada barra representa, em percentagem, as médias de células detectadas no sistema, caracterizadas como viáveis (baixa expressão de Anexina V e de 7-AAD), em processo inicial de apoptose (expressão moderada de Anexina V) e em apoptose (alta expressão de Anexina V e 7-AAD), obtida de, pelo menos, três experimentos independentes, quando comparadas à população não tratada (CT). Em alguns experimentos, as células MNC foram previamente expostas a fitohemaglutinina (PHA) por 120 h antes da exposição ao extrato. *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ * $p < 0,05$.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho fundamentou-se em avaliar a influência do extrato de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil, Lythraceae, conhecida popularmente como dedal, sobre o comportamento das linhagens celulares humanas de câncer U-937, Daudi, Jurkat, HeLa, HRT-18 e SY5Y e de células MNC humanas e de camundongos *in vitro*. Os ensaios realizados demonstraram claramente que o ExtMeOH preparado das cascas dessa planta induzem as células à apoptose e que o ácido elágico, marcador fitoquímico desta planta, não é a substância responsável pelos efeitos observados, pelo menos quando isolado. Este conjunto de dados revelou alguns aspectos interessantes e até então jamais descritos com relação às atividades biológicas do extrato de *L. pacari*, dentre eles os efeitos citostático, citotóxico e do potencial clonogênico; alteração da morfologia celular, característica do processo de apoptose, tanto em citocentrifugados como por citometria de fluxo; e a indução de apoptose observada pela co-expressão da Anexina V e 7AAD e pela análise do ciclo celular. Por outro lado, como substâncias com atividades biológicas definidas já foram isolados dessa planta, de particular interesse seria investigar e isolar quais corresponderiam aos efeitos aqui relatados. Embora estudos mais aprofundados sejam necessários, particularmente para esclarecer os mecanismos responsáveis pelas atividades biológicas aqui investigadas em níveis celular e molecular, muitos dos resultados apresentados neste estudo são inéditos e constituem uma base rica de dados científicos referentes às atividades farmacológicas dessa espécie, que pode servir como fonte preliminar de informações científicas importantes que estimulam investigações futuras.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abaza L, Talorete TP, Yamada P, Kurita Y, Zarrouk M, Isoda H 2007. Induction of growth inhibition and differentiation of human leukemia HL-60 cells by a tunisian gerboui olive leaf extract. *Biosci Biotechnol Biochem* 71: 1306-1312.
- Abbas AK, Litchman AH, Pillai S 2008. *Imunologia Celular*. São Paulo: Elsevier.
- Abdel-Massih RM, Fares R, Bazzi S, El-Chami N, Baydoun E 2010. The apoptotic and anti-proliferative activity of *Origanum majorana* extracts on human leukemic cell line. *Leukemia Res* 34: 1052-1056.
- Aisha AFA, Abu-Salah KM, Nassar ZD, Siddiqui MJ, Ismail Z, Majid AMSA 2011. Antitumorigenicity of xanthones-rich extract from *Garcinia mangostana* fruit rinds on HCT-116 human colorectal carcinoma cells. *Rev Bras Farmacogn* 21: 1026-1034.
- Akiyama H, Endo M, Matsui T, Katsuda I, Emi N, Kawamoto Y, Koike T, Beppu H 2011. Agaritine from *Agaricus blazei* Murrill induces apoptosis in the leukemic cell line U-937. *BBA – Gen Subjects* 1810: 519-525.
- Albuquerque UP, Medeiros PM, Almeida ALS 2007. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: a quantitative approach. *J Ethnopharmacol* 114: 325–354.
- Al-Dabbas MM, Suganuma T, Kitahara K, Hou DX, Fujii M 2006. Cytotoxic, antioxidant and antibacterial activities of *Varthemia iphionoides* Boiss. extracts. *J Ethnopharmacol* 108: 287-293.
- Assenmacher M, Manz R, Miltenyi S, Scheffold A, Radbruch A 1995. Fluorescence-activated cytometry cell sorting based on immunological recognition. *Clin Biochem* 28: 39-40.
- ATCC 2012a. American Type Culture Collection. Product Information Sheet for ATCC CRL-1593. Cell Line Designation: U-937. <http://www.atcc.org/attachments/17417.pdf/>, accessed Dec 2012.
- ATCC 2012b. American Type Culture Collection. Product Information Sheet for ATCC CCL-213. Cell Line Designation: Daudi. <http://www.atcc.org/attachments/17496.pdf/>, accessed Dec 2012.
- ATCC 2012c. American Type Culture Collection. Product Information Sheet for ATCC TIB-152. Cell Line Designation: Jurkat <http://www.atcc.org/attachments/17408.pdf/>, accessed Dec 2012.

- ATCC.d 2012. American Type Culture Collection. Product Information Sheet for ATCC CRM-CCL-2. Cell Line Designation: HeLa. <http://www.atcc.org/attachments/16138.pdf/>, accessed Dec 2012.
- ATCC.e 2012. American Type Culture Collection. ATCC CCL-244. Cell Line Designation: HCT-8 [HRT-18]. <http://www.atcc.org/ATCCAdvancedCatalogSearch/ProductDeTails/tabid/452/Default.aspx?ATCCNum=CCL-244&Template=cellBiology/>, accessed Dec 2012.
- ATCC.f 2012. American Type Culture Collection. Product Information Sheet for ATCC CRL-2266. Cell Line Designation: SH-5YSY. <http://www.atcc.org/attachments/17406.pdf/>, accessed Dec 2012.
- Barreira S 2000. Efeito de diferentes intensidades de corte seletivo sobre a regeneração natural de cerrado. *Cerne* 6: 40-51.
- Baxevanis CN, Perez SA, Papamichail M 2009. Combinatorial treatments including vaccines, chemotherapy and monoclonal antibodies for cancer therapy. *Cancer Immunol Immun* 58: 317-324.
- Biberfeld P 1971. Endocytosis and lysosome formation in blood lymphocytes transformed by phytohemagglutinin. *J Ultrastruct Res* 37: 41-68.
- Biberfeld P 1971. Morphogenesis in blood lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin (PHA). A light and electron microscopic study. *Acta Pathol Microbiol Scand* 223: 1-70.
- Biedler JL 1978. Multiple neurotransmitter synthesis by human neuroblastoma cell lines and clones. *Cancer Res* 38: 3751-3757.
- Bier O 1977. *Bacteriologia e Imunologia*. São Paulo: Editora Melhoramentos.
- Bieski IGC, Santos FR, Oliveira RM, Espinosa MM, Macedo M, Albuquerque UP, Martins DTO 2012. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2012: 1-36.
- BogLiolo L, Brasileiro-Filho G 2006. *Bogliolo: patologia*. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan.
- Booth GM, Malmstrom RD, Kipp E, Paul A 2012. Cytotoxicity of selected medicinal and nonmedicinal plant extracts to microbial and cervical cancer cells. *J Biomed Biotechnol* 2012: 1-4.
- Boyer GS, Leuchtenberger C, Ginsberg HS 1957. Cytological and cytochemical studies of HeLa cells infected with adeno-viruses. *J Exp Med* 105: 195-216.

- Bueno NR, Castilho RO, Costa RB, Pott A, Pott VJ, Scheidt GN, Batista MS 2005. Medicinal plants used by the Kaiowá and Guaraní indigenous populations in the Caarapó Reserve. *Acta Bot Brasilica* 19: 39-44.
- Butler MS 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J Nat Prod* 67: 2141-2153.
- Brannstrom C, Jepson W, Filippi MA, Redo D, Xu ZE, Ganesh S 2008. Land change in the Brazilian Savanna (Cerrado), 1986-2002: Comparative analysis and implications for land-use policy. *Land Use Policy* 25: 579-595.
- Brodeur GM 2003. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nature Rev Cancer* 3: 203-216.
- Bruggisser R, Daeniken Kv, Jundt G, Schaffner W, Tullberg-Reinert H 2002. Interference of plant extracts, phytoestrogens and antioxidants with the MTT tetrazolium assay. *Planta Med* 68: 445-448.
- Calixto JB 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res* 33: 179-189.
- Cassileth BR, Deng G 2004. Complementary and alternative therapies for cancer. *Oncologist* 9: 80-89.
- Chantret I, Barbat A, Dussaulx E, Brattain MG, Zweibaum A 1988. Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* 48: 1936-1942.
- Cheng AC, Jian CB, Huang YT, Lai CS, Hsu PC, Pan MH 2007. Induction of apoptosis by *Uncaria tomentosa* through reactive oxygen species production, cytochrome c release, and caspases activation in human leukemia cells. *Food Chem Toxicol* 45: 2206-2218.
- Chiruvella KK, Raghavan SC 2010. A natural compound, methyl angolensate, induces mitochondrial pathway of apoptosis in Daudi cells. *Invest New Drugs* 2010: 1-10.
- Chung JG 1998. Inhibitory actions of ellagic acid on growth and arylamine N-acetyltransferase activity in strains of *Helicobacter pylori* from peptic ulcer patients. *Microbios* 93:115-127.
- CLS 2012. Cell lines Service. HRT-18 (HCT-8). http://www.cell-lines-service.de/celllineservice/content/e3969/e4364/e4414/index_ger.html?raw=hrt%2018&ZMS_HIGHLIGHT=raw/, accessed Dec 2012.

- Corrêa MP 1984. *Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional.
- Cowden RR, Curtis SK 1981. Microfluorometric investigations of chromatin structure. I. Evaluation of nine DNA-specific fluorochromes as probes of chromatin organization. *Histochem* 72:11-23.
- Cragg GM, Newman DJ, Snader KM 1997. Natural products in drug discovery and development. *J Nat Prod* 60: 52-60.
- Cronquist A 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University.
- Dive C, Gregory CD, Phipps DJ, Evans DL, Milner AE, Wyllie AH 1992. Analysis and discrimination of necrosis and apoptosis (programmed cell death) by multiparameter flow cytometry. *BBA* 1133: 275-285.
- Edinger AL, Thompson CB 2004. Death by design: apoptosis, necrosis, and autophagy. *Current Opinion in Cell Biology* 16: 663-669.
- Faria MH, Carvalho TG, Rabenhorst SH, Sidrim JJ, Moraes-Filho MO 2006. Cytotoxic and antifungal properties of medicinal plants from Ceara, Brazil. *Braz J Biol* 66: 1133-1135.
- Farmacopeia Brasileira 2010. Determinação do resíduo seco em extratos fluidos e moles. *Farmacopeia Brasileira* 1: 204. Brasília: Anvisa.
- Festa F, Aglitti T, Duranti G, Ricordy R, Perticone P, Cozzi R 2001. Strong antioxidant activity of ellagic acid in mammalian cells *in vitro* revealed by the comet assay. *Anticancer Res* 21: 3903-3908.
- Franks LM, Teich NM 1998. *Introduction to the cellular and molecular biology of cancer*. Oxford University Press, Oxford.
- Galdino PM, Nascimento MVM, Sampaio BL, Ferreira RN, Paula JR, Costa EA 2009. Antidepressant-like effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. ethanolic extract and fractions in mice. *J Ethnopharmacol* 124: 581-585.
- Galdino PM, Nascimento MVM, Sousa FB, Ferreira RN, Paula JR, Costa EA 2010. Central activities of hydroalcoholic extract from *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. stem bark. *Braz J Pharmaceutical Sciences* 46: 455-462.
- Gao X, Zhang G, Zhou M, Luo D, Li B 2004. Antiproliferative activity of *Goldfussia psilostachys* ethanolic extract on K562 leukemia cells. *Fitoterapia* 75:639-644

- Ghosh P, Besra SE, Tripathi G, Mitra S, Vedasiromoni JR 2006. Cytotoxic and apoptogenic effect of tea (*Camellia sinensis* var. *assamica*) root extract (TRE) and two of its steroidal saponins TS1 and TS2 on human leukemic cell lines K562 and U-937 and on cells of CML and ALL patients. *Leukemia Res* 30: 459-468.
- Giri B, Gomes A, Debnath A, Saha A, Biswas AK, Dasgupta SC, Gome A 2006. Antiproliferative, cytotoxic and apoptogenic activity of Indian toad (*Bufo melanostictus*, Schneider) skin extract on U937 and K562 cells. *Toxicon* 48: 388-400.
- Guarim-Neto G 1987. *Plantas utilizadas na medicina popular no estado de Mato Grosso*. Brasília: CNPq.
- Guerra MR, Gallo CVM, Mendonça GAS 2005. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev Bras Cancer* 51: 227-234.
- GraTus C, Wilson S, Greenfield SM, Damery SL, Warmington SA, Grieve R, Steven NM, Routledge P 2009. The use of herbal medicines by people with cancer: a qualitative study. *BMC Complementary and Alternative Medicine* 9: 94.
- Han DH, Lee MJ, Kim JH 2006. Antioxidant and apoptosis-inducing activities of ellagic acid. *Anticancer Res* 26: 3601-3606.
- Harris P, Ralph P 1985. Human Leukemic Models of Myelomonocytic Development: A Review of the HL-60 and U937 cell lines. *J Leukocyte Biol* 37: 407-422.
- Hayes JE, Allen P, Brunton N, O'Grady MN, Kerry JP 2011. Phenolic composition and *in vitro* antioxidant capacity of four commercial phytochemical products: Olive leaf extract (*Olea europaea* L.), lutein, sesamol and ellagic acid. *Food Chem* 126: 948-955.
- Herrmann F, Wink M 2011. Synergistic interactions of saponins and monoterpenes in HeLa cells, Cos7 cells and in erythrocytes. *Phytomedicine* 18: 1191-1119.
- INCA 2009. *Instituto Nacional de Câncer: Estimativa 2010, Incidência de Câncer no Brasil*. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/estimativa20091201.pdf/>, accessed Dec 2012.
- INCA 2011. *Instituto Nacional de Câncer: Estimativa 2012, Incidência de Câncer no Brasil*. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf/>, accessed Dec 2012.
- Inoue M, Tajima K, Mizutani M, Iwata H, Iwase T, Miura S, Hirose K, Hamajima N, Tominaga S 2001. Regular consumption of green tea and the risk of breast cancer recurrence: follow-up study from the Hospital-based Epidemiologic Research Program at Aichi Cancer Center (HERPACC), Japan. *Cancer Lett* 167: 175-182.

- Jankun J, Selman SH, Swiercz R, Skrzypczak-Jankun E 1997. Why drinking green tea could prevent cancer. *Nature* 387: 561.
- Jimenez-Medina E, Garcia-Lora A, Paco L, Algarra I, Collado A, Garrido F 2006. A new extract of the plant *Calendula officinalis* produces a dual *in vitro* effect: cytotoxic anti-tumor activity and lymphocyte activation. *BMC Cancer* 6: 119-133.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AH 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257.
- Khan MT, Lampronti I, Martello D, Bianchi N, Jabbar S, Choudhuri MS, Datta BK, Gambari R 2002. Identification of pyrogallol as an antiproliferative compound present in extracts from the medicinal plant *Embllica officinalis*: effects on *in vitro* cell growth of human tumor cell lines. *Int J Oncol* 21:187-192.
- Kim EK, Kwon KB, Han MJ, Song MY, Lee JH, Ko YS, Shin BC, Yu J, Lee YR, Ryu DG, Park JW, Park BH 2007. Induction of G1 arrest and apoptosis by *Scutellaria barbata* in the human promyelocytic leukemia HL-60 cell line. *Int J Mol Med* 20: 123-128.
- Kim SP, Kang MY, Choi YH, Kim JH, Nam SH, Friedman M 2011. Mechanism of *Hericium erinaceus* (Yamabushitake) mushroom-induced apoptosis of U937 human monocytic leukemia cells. *Food Funct* 2: 348-356.
- Klein G, Klein E, Clifford P 1967. Search for host defenses in Burkitt lymphoma: membrane immunofluorescence tests on biopsies and tissue culture lines. *Cancer Res* 27: 2510-2520.
- Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST, VanOers MH. 1994. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. *Blood* 84: 1415-1420.
- Kubbies M, Schindler D, Hoehn H, Rabinovitch PS 1985. Cell cycle kinetics by BrdU-Hoechst flow cytometry: an alternative to the differential metaphase labeling technique. *Cell Tissue Kinet* 18: 551-562.
- Kumagai T, Muller CI, Desmond JC, Imai Y, Heber D, Koeffler HP 2007. *Scutellaria baicalensis*, a herbal medicine: anti-proliferative and apoptotic activity against acute lymphocytic leukemia, lymphoma and myeloma cell lines. *Leuk Res* 31: 523-530.
- Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Mitchell RN 2008. *Robbins - Patologia Básica*. Rio de Janeiro: Editora Elsevier.
- Kurahashi N, Sasazuki S, Iwasaki M, Inoue M, Tsugane S 2007. Green tea consumption and prostate cancer risk in Japanese men: a prospective study. *Am J Epidemiol* 167: 71-77.

- Kwak CS, Moon SC, Lee MS 2006. Antioxidant, antimutagenic, and antitumor effects of *Pinus densiflora*. *Nutr Cancer* 56: 162-171.
- Lantto TA, Colucci M, Závadová V, Hiltunen R, Raasmaja A 2009. Cytotoxicity of curcumin, resveratrol and plant extracts from basil, juniper, laurel and parsley in SH-SY5Y and CV1-P cells. *Food Chem* 117: 405-411.
- Lauthier F, Taillet L, Trouillas P, Delage C, Simon A 2000. Ursolic acid triggers calcium-dependent apoptosis in human Daudi cells. *Anticancer Drugs* 11: 737-745.
- Lee GR, Bithell TC, Foerster J, Athens JW, Lukens JN 1999. *Wintrobe's clinical hematology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Leveque D, Jehl F 2007. Molecular pharmacokinetics of *Catharanthus* (vinca) alkaloids. *J Clin Pharmacol* 47: 579-588.
- Li H, Wang P, Liu Q, Cheng X, Zhou Y, Xiao Y 2012. Cell cycle arrest and cell apoptosis induced by *Equisetum hyemale* extract in murine leukemia L1210 cells. *J Ethnopharmacol* 144: 322-327.
- Li JWH, Vederas JC 2009. Drug discovery and natural products: End of an era or an endless frontier? *Science* 325: 161-165.
- Lim H, Kim MK, Lim Y, Cho YH, Lee CH 2006. Inhibition of cell-cycle progression in HeLa cells by HY52, a novel cyclin-dependent kinase inhibitor isolated from *Bauhinia forficata*. *Cancer Lett* 233: 89-97.
- Lima MRF, Luna JS, Santos AF, Andrade MCC, Sant'Ana AEG, Genet JP, Marquez B, Neuville L, Moreau N 2006. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. *J Ethnopharmacol* 105: 137-147.
- Lima MP 2008. *Influência de extratos de plantas medicinais brasileiras sobre o comportamento de células hematopoiéticas in vitro*. Curitiba, 94p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.
- Ling J, Wiederkehr U, Cabiness S, Shroyer KR, Robinson JP 2008. Application of flow cytometry for biomarker-based cervical cancer cells detection. *Diag Cytopathol* 36: 76-84.
- Lis H, Sharon N 1973. The biochemistry of plant lectins (phytohemagglutinins). *Annu Rev Biochem* 42: 541-574.

- Liu G, Robins HI 2006. *Manual de Oncologia Clínica UICC*. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo.
- Lorenzi H 1998. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Plantarum.
- Macey MG 1994. *Flow cytometry - clinical applications*. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Magnotta M, Murata J, Chen J, De Luca V 2007. Expression of deacetyltransferase in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Phytochemistry* 68: 1922-1931.
- Majewska A, Hoser G, Furmanowa M, Urbanska N, Pietrosiuk A, Zobel A, Kuras M 2006. Antiproliferative and antimitotic effect, S phase accumulation and induction of apoptosis and necrosis after treatment of extract from *Rhodiola rosea* rhizomes on HL-60 cells. *J Ethnopharmacol* 103: 43-52.
- Malerba I, Castoldi AF, Parent-Massin D, Gribaldo L 2002. *In vitro* myelotoxicity of propanil and 3,4-dichloroaniline on murine and human CFUE/ BFU-E progenitors. *Toxicol Sci* 69: 433-438.
- Mann J 2002. Natural products in cancer chemotherapy: past, present and future. *Nature Reviews Cancer* 2: 143-148.
- Manosroi J, Boonpisuttinant K, Manosroi W, Manosroi A 2012. Anti-proliferative activities on HeLa cancer cell line of Thai medicinal plant recipes selected from MANOSROI II database. *J Ethnopharmacol* 142: 422-431.
- Mans DRA, Rocha AB, Schwartzman G 2000. Anti-cancer drug discovery and development in Brazil: targeted plant collection as a rational strategy to acquire candidate anti-cancer compounds. *Oncologist* 5: 185-198.
- Martin SJ, Reutelingsperger CP, McGahon AJ, Rader JA, Van-Schie RC, Laface DM, Green DR 1995. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med* 182: 1545-1556.
- Meier P, Finch A, Evan G 2000. Apoptosis in development. *Nature* 407: 796-801.
- Melo JG, Martins JDGDR, Amorim ELC, Albuquerque UP 2007. Qualidade de produtos a base de plantas medicinais comercializados no Brasil: castanha-da-índia (*Aesculus hippocastanum* L.), capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf) e centela (*Centella asiatica* (L.)Urban). *Acta Bot Bras* 21: 27-36.

- Melo JG, Santos AG, Amarin ELC, Nascimento SC, Albuquerque UP 2011. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 1-14.
- Melo Júnior EJM, Raposo MJ, Sant'Ana AE, Lisboa Neto JA, Diniz MFA 2000. Estudo de plantas medicinais com atividade antimicrobiana sobre microorganismos presentes na alveolite. *Rev ABO Nacional* 8: 220-226.
- Melo Júnior EJM, Lisboa Neto JA, Diniz MF, Marcelino Júnior CA, Sant'Ana AE 2002. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: microbiological and microscopic analysis. *Phytomedicine* 9: 109-116.
- Merchant D, Kahn R, Murphy W 1964. *Handbook of cell and organ culture*. Burgess Publishing.
- Mertens-Talcott SU, Percival SS 2005. Ellagic acid and quercetin interact synergistically with resveratrol in the induction of apoptosis and cause transient cell cycle arrest in human leukemia cells. *Cancer Lett* 218: 141-151.
- Mesquita ML, Paula JE, Pessoa C, Moraes MO, Costa-Lotufo LV, Grougnet R, Michel S, Tillequin F, Espindola LS 2009. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 123: 439-445.
- Michaleck AM, Buck GM, Nasca PC, Freedman AN, Baptiste MS, Mahoney MC 1996. Gravid health status, medication use, and risk of neuroblastoma. *Am J Epidemiology* 143: 996-1001.
- Ministério da Saúde 2006. *Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006 em que aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde*. Ministério da Saúde, Brasil.
http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt0971_03_05_2006.html, accessed Dec 2012.
- MosMann T 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol* 65: 55-63.
- Motomura M, Kwon KM, Suh SJ, Lee YC, Kim YK, Lee IS, Kim MS, Kwon DY, Suzuki I, Kim CH 2008. Propolis induces cell cycle arrest and apoptosis in human leukemic U937 cells through Bcl-2/Bax regulation. *Environ Toxicol Phar* 26: 61-67.
- Mundo SR 2007. *Caracteres morfoanatômicos de folha e caule de espécies brasileiras de uso medicinal: Calophyllum brasiliense Cambess. (Clusiaceae), Cupania vernalis Cambess. (Sapindaceae) e Lafoensia pacari A. St.-Hil. (Lythraceae)*. Curitiba, 78p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

- Nam SY, Yi HK, Lee JC, Kim JC, Song CH, Park JW, Lee DY, Kim JS, Hwang PH 2002. *Cortex mori* extract induces cancer cell apoptosis through inhibition of microtubule assembly. *Arch Pharm Res* 25: 191-196.
- Narayanan BA, Geoffroy O, Willingham MC, Gian GR, Nixon Dw 1999. P53/p21(WAF1/CIP1) expression and its possible role in G1 arrest and apoptosis in ellagic acid treated cancer cells. *Cancer Lett* 136: 215-221.
- Nicholson DW 2000. From bench to clinic with apoptosis based therapeutic agents. *Nature* 407: 810-816.
- Nowell PC 1960. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes. *Cancer Res* 20: 462-466.
- Ong ES 2004. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *J Chromatogr B* 812: 23-33.
- Parchment RE 1998. Alternative testing systems for evaluating noncarcinogenic, hematologic toxicity. *Environ Health Perspect* 106: 541-557.
- Park Jw, Choi YJ, Jang MA, Lee YS, Jun DY, Suh SI, Baek WK, Suh MH, Jin IN, Kwon TK 2001. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells. *Cancer Lett* 163: 43-49.
- Peng L, Wang B, Ren P 2005. Reduction of MTT by flavonoids in the absence of cells. *Colloid Surface B* 45: 108-111.
- Perez RO, Habr-Gama A, Jacob CE, Souza Jr AHS, Picolo MM, Pécora RA 1998. A genética do câncer colorretal. *Rev bras Colo-Proct* 18: 5-10.
- Puangpraphant S, Berhow MA, Mejia EG 2011. Mate (*Ilex paraguariensis* St. Hilaire) saponins induce caspase-3-dependent apoptosis in human colon cancer cells in vitro. *Food Chem* 125: 1171-1178.
- Ransohoff DF 2005. Colon cancer screening in 2005: status and challenges. *Gastroenterol* 128: 1685-1695.
- PhilLipson JD 2001. Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochem* 56: 237-243.
- Proença C, Oliveira RS, Silva AP 2000. *Flores e frutos do cerrado*. Brasília: EdUnB, São Paulo: Imprensa oficial.

- Purves D, Harvey C, Tweats D, Lumley CE 1995. Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. *Mutagenesis* 10: 297-312.
- Ratter JA, Bridgewater S, Ribeiro JF 2001. Woddy species found in cerrado (broad sense) habitat from 170 locations in cerrado ecosystem. *Boletim Herbario-Ezechias Paulo Heringer* 7: 5-112.
- Robinson JP 1993. *Handbook of flow cytometry methods*. New York: Willey-Liss Inc.
- Rogério AP, Sá-Nunes A, Albuquerque DA, Anibal FF, Medeiros AI, Machado ER, Souza AO, Prado Jr JC, Faccioli LH 2003. *Lafoensia pacari* extract inhibits IL-5 production in toxocariasis. *Parasite Immunol* 25: 393-400.
- Rogério AP, Fonatanari C, Borducchi E, Keller AC, Russo M, Soares EG, Albuquerque DA, Faccioli LH 2007. Anti-inflammatory effects of *Lafoensia pacari* and ellagic acid in a murine model of asthma. *Eur J Pharmacol* 580: 262-270.
- Rogério AP, Sá-Nunes A, Albuquerque DA, Soares EG, Faccioli LH 2008. Anti-eosinophilic effect of *Lafoensia pacari* in toxocariasis. *Phytomedicine* 15: 348-357.
- Rogério AP, Sá-Nunes A, Faccioli LH 2010. The activity of medicinal plants and secondary metabolites on eosinophilic inflammation. *Pharmacol Res* 62: 298-307.
- Sahoo N, Manchikanti P, Dey S 2010. Herbal drugs: Standards and regulation. *Fitoterapia* 81: 462-471.
- Salatino A, Salatino MLF, Santos DYAC, Patrício MCB 2000. Distribution and evolution of secondary metabolites in Eriocaulaceae, Lythraceae and Velloziaceae from "campos rupestres". *Genet Mol Biol* 23: 931-940.
- Santos DYAC, Salatino MLF, Salatino A 2000. Foliar flavonoids of *Lafoensia* (Lythraceae). *Biochem Syst Ecol* 28: 487-488.
- Shafi G, Munshi A, Hasan TN, Alshatwi AA, Jyothy A, Lei DKY 2009. Induction of apoptosis in HeLa cells by chloroform fraction of seed extracts of *Nigella sativa*. *Cancer Cell Inter* 9: 29.
- Shapiro HM 1985. *Practical flow cytometry*. New York: Alan R. Liss, Inc.
- Sherr CJ 1996. Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677.
- Schmid I, Krall WJ, Uittenbogaart CH, Braun J, Giorgi JV 1992. Dead cell discrimination with 7-amino-actinomycin D in combination with dual color immunofluorescence in single laser flow cytometry. *Cytometry* 13: 204-208.

- Schmidt DFN, Yunes RA, Schaab EH, Malheiros A, Cechinel Filho V, Franchi Jr GC, Nowill AE, Cardoso AA, Yunes JA 2006. Evaluation of the anti-proliferative effect the extracts of *Allamanda blanchetti* and *A. schottii* on the growth of leukemic and endothelial cells. *J Pharm Pharmaceut Sci* 9: 200-208.
- Schneider U, Schwenk H, Bornkamm G 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma". *Int J Cancer* 19: 621-626.
- Schneider-Gadicke A, Schwarz E 1986. Different human cervical carcinoma cell lines show similar transcription patterns of human papillomavirus type 18 early genes. *EMBO J* 5: 2285-2292.
- Silva IE, Cechinel-Filho V, Zacchino SA, Lima JCS, Martins DTO 2009. Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso - Cerrado. *Rev Bras Farmacogn* 19: 242-248.
- Silva Júnior MC 2005. *100 Árvores do cerrado: Guia de campo*. Brasília: Ed. Rede de sementes do cerrado.
- Silva Júnior IF, Raimondi M, Zacchino S, Cechinel Filho V, Noldin VF, Rao VS, Lima JCS, Martins DTO 2009. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark extracts, fractions and ellagic acid. *Rev Bras Farmacogn* 20: 422-428.
- Simões CMO, Falkenberg MB, Santos RI 2005. Introdução à análise fitoquímica. Cap. 10. In: Simões CMO, Schenkel EP, Grosmann G, Mello JCP, Mentz LM, Petrovik PR (Eds). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis. Ed. UFRGS/Ed. UFSC.
- Skloot R 2011. *A vida imortal de Henrietta Lacks*. São Paulo. Ed. Schwarcz Ltda.
- Solon S 1999. *Alguns aspectos químicos da entrecasca do caule de Lafoensia pacari St. Hil. (Mangava brava, Lythraceae)*. 1999. Cuiabá, 147p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Saúde e Ambiente, Universidade Federal de Mato Grosso.
- Solon S, Lopes L, Sousa Jr PTS, Schmeda-Hirschmann G 2000. Free radical scavenging activity of *Lafoensia pacari*. *J Ethnopharmacol* 72: 173-178.
- Stephen A, Cannistra MD, Jonathan M, Niloff M 1996. Cancer of the uterine cervix. *N Engl J Med* 334: 1030-1037.
- Sundstrom C, Nilsson K 1976. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U-937). *Int J Cancer* 17: 565-577.

- Surth YJ 2003 Cancer chemoprevention with dietary phytochemicals. *Nature Rev Cancer* 3: 768-780.
- Tai J, Cheung S, Cheah S, Chan E, Hasman D 2006. *In vitro* antiproliferative and antioxidant studies on Devil's Club *Oplopanax horridus*. *J Ethnopharmacol* 108: 228-235.
- Tamashiro Filho P 1999. *Avaliação da atividade antiúlcera do extrato bruto metanólico de Lafoensia pacari St. Hil. (mangava brava)*. Cuiabá, 128p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Saúde Pública e Ambiente, Universidade Federal de Mato Grosso.
- Tamashiro Filho P, Olaitan BS, Almeida DAT, Lima JCS, Marson-Ascêncio PG, Ascêncio SD, Rios-Santos F, Martins DTO 2012. Evaluation of antiulcer activity and mechanism of action of methanol stem bark extract of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. (*Lytraceae*) in experimental animals. *J Ethnopharmacol* 144: 497-505.
- Tayarani-Najaran Z, Emami SA, Asili J, Mirzaei A, Mousavi SH 2011. Analyzing cytotoxic and apoptogenic properties of *Scutellaria litwinowii* root extract on cancer cell lines. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 1-9.
- Tompkins WA 1974. Cultural and antigenic properties of newly established cell strains derived from adenocarcinomas of the human colon and rectum. *J Natl Cancer Inst* 52: 1101-1110.
- Tonello VM 1997. *Estrutura de populações de Lafoensia pacari St. Hil. e dados etnobotânicos e fenológicos em Nossa Senhora do Livramento, Mato Grosso*. Cuiabá, 94p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Ecologia e Conservação da Biodiversidade, Universidade Federal de Mato Grosso.
- Tu Y, Cheng S, Zhang S, Sun H, Xu Z 2012. Vincristine induces cell cycle arrest and apoptosis in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Int J Mol Med* 31: 113-119.
- Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C 1995. A novel assay for apoptosis: Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods* 184: 39-51.
- Vermeulen SJ, Chen TR, Speleman F, Nollet F, Van Roy FM, Mareel MM 1998. Did the four human cancer cell lines DLD-1, HCT-15, HCT-8, and HRT-18 originate from one and the same patient? *Cancer Genet Cytogenet.* 107: 76-79.
- Vinatoru M 2001. An overview of the ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from herbs. *Ultrason Sonochem* 8: 303-313.

- Vousden KH 2002. Activation of the p53 tumor suppressor protein. *BBA-Rev Cancer* 1602: 47-59.
- Yaffe PB, Doucette CD, Walsh M, Hoskin DW 2013. Piperine impairs cell cycle progression and causes reactive oxygen species-dependent apoptosis in rectal cancer cells. *Exp Mol Pathol* 94: 109-111.
- Yeh CT, Yao CJ, Yan, JL, Chuang SE, Lee LM, Chen CM, Yeh CF, Li CH, Lai GM 2011. Apoptotic cell death and inhibition of wnt/ β -catenin signaling pathway in human colon cancer cells by an active fraction (HS7) from *Taiwanofungus camphoratus*. *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine* 2011: 1-13.
- Yokota J 2000. Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21: 497-503.
- Yuspa SH 2000. Overview of carcinogenesis: past, present and future. *Carcinogenesis* 21: 341-344.
- Wagner H, Bladt S 1996. *Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas*. Heidelberg: Springer.
- Weinberg RA, Hanahan D 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100: 57-70.
- Werneke U, Earl J, Seydel C, Horn O, Crichton P, Fannon D 2004. Potential health risks of complementary alternative medicines in cancer patients. *Br J Cancer* 90: 408-413.
- Zelenin AV, Poletaev AI, Stepanova NG, Barsky VE, Kolesnikov VA, Nikitin SM, Zhuze AL, Gnutchchev NV 1984. 7-Amino-actinomycin D as a specific fluorophore for DNA content analysis by laser flow cytometry. *Cytometry* 5: 348-354.

ANEXO A



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 29123-1	Data da Emissão: 20/05/2011 13:50
Dados do titular	
Nome: Cid Aimbiré de Moraes Santos	CPF: 394.635.839-04

Ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
7	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .

Táxons registrados

Nível taxonômico	Táxon(s)
FAMILIA	Lythraceae
FILO	Angiospermae

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 93499461



ANEXO B



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Curitiba, 28 de abril de 2.004.

Ilmo (a) Sr. (a)
ALMERIANE MARIA WEFFORT SANTOS
Nesta

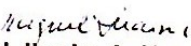
Prezado(a) Senhor(a):

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "ESTUDO *IN VITRO* DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE COMPOSTOS ISOLADOS OU DERIVADOS DE PLANTAS MEDICINAIS", está de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Resolução nº 196/96 do Ministério da Saúde, foi analisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde da UFPR em reunião do dia 28 de abril de 2.004.

Registro CEP/SD: 039.SI.003/04-01

Sendo o que se apresenta para o momento, subscrevo-me,

Atenciosamente


Prof. Dr. Miguel Ibrahim A. Hanna Sobrinho
Coordenador do Comitê de Ética em
Pesquisa do Setor de Ciências da Saúde

Endereço: Rua Padre Camargo, 280 – Alto da Glória – Curitiba-Pr. – CEP: 80060-240
Fone/fax: 41-360-7259 – e-mail: cometica@saude.ufpr.br

ANEXO C



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comitê de Ética em Experimentação Animal
(CEEa)



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEa) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento do CEEa, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno do CEEa, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEEa internal regiment, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

PROCESSO: 23075.028831/2008-33

APROVADO:

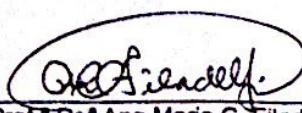
08/07/2008 – R.O. 06/2008

TÍTULO: Influência de extratos e compostos isolados de plantas medicinais sobre a proliferação e a diferenciação de progenitores hematopoiéticos de camundongos *in vitro*

AUTORES:

Almeriane Maria Weffort Santos, Cid Aimbiré de Moraes Santos,
Luciana Farah Hilst

DEPARTAMENTO: Patologia Médica


Prof.ª Dr.ª Ana Maria C. Filadelfi
Coordenadora do CEEa